

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES VACCINS

THÈSE

POUR

l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université

(MENTION PHARMACIE).

Présentée et soutenue le 17 novembre 1923

PAR

J. FABICKI

PHARMACIEN DE L'UNIVERSITÉ DE DORPAT (RUSSIE)

Né à Radom (Pologne) le 26 mai 1889

Examineurs de la Thèse

{ MM. BRUNTZ, *Président.*
LASSEUR
VERNIER } *Juges.*

NANCY
IMPRIMERIE CAMILLE ANDRE

1, Boulevard d'Alsace-Lorraine

1923

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES VACCINS

THÈSE

POUR

l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université
(MENTION PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 17 novembre 1923

PAR

J. FABICKI

PHARMACIEN DE L'UNIVERSITÉ DE DORPAT (RUSSIE)

Né à Radom (Pologne) le 26 mai 1889



Examineurs de la Thèse

{ MM. BRUNTZ, *Président.*
LASSEUR
VERNIER } *Juges.*

NANCY
IMPRIMERIE CAMILLE ANDRÉ
1, Boulevard d'Alsace-Lorraine

1923

Doyen : M. BRUNTZ, *, **, I O, O.

Assesseur : M. PASTUREAU, *, O.

PROFESSEURS :

MM. FAVREL, *, I O		Chimie organique.
GRÉLOT, *, I O, O	...	Pharmacie galénique.
BRUNTZ, *, **, I O, O, *	*	Matière médicale.
DOURIS, O, O, *		Toxicologie et Analyse chimique.
PASTUREAU, *, O		Pharmacie chimique.
SEYOT, *, O		Histoire naturelle.
LASSEUR, O, O		Microbiologie.

AGRÉGÉ LIBRE :

M. GIRARDET, I O		Chimie et Toxicologie.
------------------	-------	------------------------

CHARGÉS DE COURS :

MM. FAVREL, *, I O		Chimie minérale et Minéralogie.
GRÉLOT, *, I O, O	...	Hydrologie.
BRUNTZ, *, **, I O, O, *	*	Zoologie.
DOURIS, O, O, *		Chimie biologique.
PILLOT, I O		Physique.
BUSQUET, I O		Pharmacodynamie.
VERNIER, I O		Hygiène.
RENARD, I O		Législation et Déontologie.

CHEFS DE TRAVAUX :

MM. CORDEBARD, O, O		Toxicologie, Chimie, Analyse chimique.
PILLOT, I O	chargé d. trav.	Physique.
MANGENOT		Micrographie.
VERNIER, I O		Microbiologie et Parasitologie.
GILLOT, O, O		Pharmacie.

SECRÉTARIAT :

MM. BERTRAND, I O		Secrétaire.
F. LAMBERT DES CILLEULS, *, O, I O		Secrétaire honoraire.
ROVEL, I O		Secrétaire en disponibilité.

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propre à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

INTRODUCTION

Dans ce mémoire, j'étudie comparativement la valeur immunogène de différentes formes de vaccins d'un même microbe : le Staphylocoque.

Ayant remplacé, en 1916, le Professeur AVROROFF (de l'Université de Tomsk), au laboratoire militaire ambulante de la 1^{re} Armée, j'ai eu l'occasion de préparer un grand nombre d'auto-vaccins. J'ai constaté, à maintes reprises, l'insuccès de la sérothérapie dans de nombreuses maladies infectieuses, et les excellents résultats fournis par la vaccination dans la furonculose et la fièvre typhoïde. Ces résultats ont attiré tout particulièrement l'attention du corps de santé sur la possibilité de créer une immunité active, soit dans un but curatif, soit dans un but préventif.

A vrai dire, la vaccinothérapie n'est peut-être pas toujours utilisée à bon escient, et la réserve qui accueillit les travaux de Ferran et de Wright a fait suite à un enthousiasme qui n'est peut-être pas toujours très justifié; mais c'est là un point particulier sur lequel j'aurai l'occasion de revenir ultérieurement.

Quoi qu'il en soit, il faut bien reconnaître que dans de nombreux cas, l'emploi de virus atténués a permis d'obtenir des guérisons inespérées. Aussi a-t-on successivement préconisé un nombre considérable de vaccins. Mais, il n'est nullement démontré que tous soient d'égale valeur. Que l'on utilise

les vaccins dans un but préventif ou dans un but curatif, tous doivent permettre d'atteindre l'état de résistance ou état réfractaire. Il ne suffit pas d'atteindre ce but, encore faut-il y arriver avec le minimum de dépense de la part de l'organisme. Ce second desideratum avait été négligé au début où l'on croyait que l'immunité ne pouvait être acquise qu'au prix de réactions violentes de l'organisme. Or, il n'est nullement nécessaire de déterminer des réactions violentes pour aboutir à l'état réfractaire; ces réactions rentrent le plus souvent dans le cadre de la protéinothérapie et de l'anaphylaxie. Un organisme sain, et c'est le cas de la vaccination préventive, peut se permettre le luxe de fortes réactions, mais un individu affaibli (cas de la vaccination curative) demandera à ce que l'état de résistance soit acquis avec le minimum de dépense. Par suite, de deux vaccins, le meilleur sera celui qui permettra d'obtenir le plus rapidement possible l'immunité avec le minimum de frais de la part de l'organisme. Enfin, un vaccin ne pouvant pas être utilisé généralement en une seule injection, il est évident que l'on devra attacher une grande importance à la chute du pouvoir immunisant avec le temps. Le bon vaccin doit avoir un délai d'utilisation assez long.

Qualité immunogène élevée, réactions (locale, focale, ou générale) faibles, conservation longue, telles sont les qualités que chaque auteur a successivement attribué aux vaccins chauffés, étherés, sensibilisés, formolés, iodés et fluorés.

Il est évident que seule l'expérimentation sur l'homme permet de déterminer avec précision la valeur d'un vaccin. Mais il est non moins certain que l'on ne saurait trop condamner les pratiques qui consistent à injecter n'importe quoi à n'importe qui ? Avant d'aborder l'expérimentation humaine,

il est donc bon d'arriver à une première approximation.
On y parvient en étudiant :

1^o La Cytologie;

2^o Les pouvoirs agglutinogène, sensibilisogène et antitoxigène des vaccins.

Tout d'abord, les vaccins sont généralement constitués par des corps microbiens (1) ne produisant pas ou peu de toxines solubles; les germes agissent par leurs endotoxines (toxine soluble de NICOLLE). Par suite, le mode d'atténuation qui respectera l'intégrité du plastide bactérien aura, à priori, beaucoup plus de chance de ne pas altérer fondamentalement l'endotoxine, que le procédé d'atténuation qui amènera la bactériolyse. Dans ce dernier cas, avec la fonte plus ou moins accentuée du plastide, nous déterminerons parallèlement une dislocation de la molécule toxique qui, si elle se poursuit trop loin, enlèvera évidemment toute action toxique aux corps microbiens, et souvent aussi, son pouvoir antitoxigène. Cela se comprend aisément : Injectons une molécule complexe Xc, nous provoquerons dans l'organisme la formation d'une antitoxine A Xc. Par une manipulation antérieure à l'inoculation, déterminons une faible dislocation de Xc, le produit Xc', Xc'' obtenu sera peu différent du produit initial et l'antitoxine A Xc', sera peu différente de l'antitoxine A Xc; par suite, nous pouvons compter sur un excellent effet thérapeutique. Mais si la molécule Xc est devenue Xb ou Xd à la suite des manipulations destinées à tuer le plastide, il est évident que l'antitoxine A Xb et A Xd ne sera plus que

(1) Il existe des exceptions, exemple : la vaccinothérapie antidiphthérique utilise le mélange toxine + antitoxine.

partiellement fixée par la toxine Xc, et l'effet thérapeutique sera ramené à cette légère amélioration passagère que donne toute réaction humorale. Mais il ne saurait être question de guérison ou d'amélioration durable et notable. Nous sommes ainsi conduit à étudier comparativement le plastide bactérien avant et après l'action de l'agent atténuant.

Dans la deuxième partie de mon travail, j'étudie donc la morphologie du Staphylocoque :

1° Avant l'action des agents atténuants;

2° Après l'action de divers agents d'atténuation (chaleur, éther, iode, formol).

Cependant, il ne saurait y avoir de parallélisme très rigoureux entre l'intégrité du plastide et sa valeur thérapeutique, aussi, est-il nécessaire d'avoir recours à l'étude des pouvoirs sensibilisogènes « agglutinogènes ». C'est l'objet de la troisième partie de ce mémoire.

Mais, avant d'étudier un vaccin, il faut le préparer. Pour cela, il est nécessaire de produire en grand les corps microbiens, de les numérer, de les soumettre à l'action de différents agents. C'est la technique conduisant à ces résultats que j'étudie dans la première partie de ce travail.

En général, mon expérimentation portera surtout sur le Staphylocoque; cependant, dans certains cas, j'ai utilisé le Colibacille, le Proteus, etc...

En ce qui concerne le Staphylocoque, j'ai étudié différentes souches isolées au Laboratoire de Microbiologie. Ces germes provenaient d'abcès divers.

Tout le monde sait ce que l'on entend par Staphylocoque : *Coccus pyogènes* en amas, en grappe de raisin, mais il

n'est peut-être pas superflu de préciser certains points historiques de l'étude des germes pyogènes.

WEBER (1863) (1) constate la présence des *Staphylocoques* dans le pus et leur donne le nom de « *vibrion du pus* ».

RINDFLEISCH (1866) confirme les observations de WEBER.

Puis PASTEUR (1878) montre le rôle du *Staphylocoque* dans la suppuration. Le génial savant ne se borne pas à dire que le *Staphylocoque* est un agent de la suppuration, il le démontre en provoquant la formation d'abcès à l'aide de *Staphylocoques* isolés du milieu extérieur. Enfin KOCH (1880) (2), poursuit les recherches entreprises par PASTEUR. Mais la nomenclature ne perd pas ses droits et OGSTONE (1881) propose le terme de *Staphylococcus* pour désigner l'agent de la suppuration.

ROSENBACH (1884) (1) montre bientôt que le *Staphylocoque* possède des variétés, et on créa les races de aureus, citreus albus. Aujourd'hui, on admet que l'espèce est une, mais qu'il existe des types différents; d'où la notion de vaccins polyvalents.

Mes recherches ont été effectuées au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Nancy.

J'adresse à Monsieur le Doyen BRUNTZ, l'hommage de ma respectueuse reconnaissance pour l'extrême bienveillance qu'il n'a cessé de me témoigner durant mon séjour en Lorraine et pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir présider la soutenance de ma thèse.

(1) In JUREVITSCH. — *Staphylococcus pyogenes aureus*, etc... Medicinskaja mikrobiologia. Tom 2. Glava 3. str. 119. Kiev 1912.

(2) *Id.*

Comment marquer à l'éminent Professeur Monsieur LASSEUR, la profonde reconnaissance dont mon cœur est pénétré ? A tous les titres, il a droit à ma gratitude infinie. Nombreux sont les bienfaits qu'il a semés sur mon passage en cette Université si bienveillante envers l'exilé, retrouvant un accueil familial au sein de cette douce France, amie et alliée de ma chère Patrie.

Non content de suivre pas à pas mes recherches parfois pénibles, il a soutenu mes efforts laborieux, critiquant avec justesse les moyens techniques envisagés, discutant ou interprétant les résultats avec la meilleure grâce du monde. A cet intègre savant, j'adresse d'un cœur ému, l'expression de mon éternelle reconnaissance.

Que Messieurs les Professeurs de la Faculté de Pharmacie et, en particulier, Monsieur FAVREL, veuillent bien accepter mes sincères remerciements et mes respectueux hommages.

Je suis infiniment heureux de remercier aussi l'Association générale des Pharmaciens Polonais qui m'a permis d'élargir le cercle des connaissances déjà acquises, en approfondissant les éléments de cette science bactériologique immortalisée par le génie de l'illustre Pasteur.

Mes remerciements vont encore à l'Association des Anciens Etudiants de la Faculté de Pharmacie de Nancy. Leur généreuse intervention m'a gratifié d'une bourse facilitant mon séjour à Nancy. A tous, j'adresse ce simple mot : Merci !

PREMIÈRE PARTIE

TECHNIQUE

Milieux nutritifs

En bactériothérapie, on tend de plus en plus aujourd'hui à utiliser les milieux électifs pour le germe considéré. En opérant ainsi, on a moins en vue l'isolement du germe, qui peut être en général très facilement réalisé, que la production rapide des corps microbiens; cela, pour deux raisons : dans la vaccinothérapie, on a toujours intérêt à préparer le vaccin dans un minimum de temps, de plus, il faut éviter les passages répétés sur milieux de culture, car on sait avec quelle facilité certains germes perdent ainsi leur virulence et souvent, corrélativement, leur pouvoir immunisant.

Milieux nutritifs pour le Staphylocoque. — En ce qui concerne le Staphylocoque, différents milieux ont été préconisés; nous n'en retiendrons que deux : le milieu de NOIRÉ (1913), et celui de SIERAKOWSKI (1922).

NOIRÉ utilise la gélose préparée de la façon suivante :

Eau distillée	1000 gr.
Peptone	20
Glucose massé	20
Lactose	40
Urée	4
Chlorure de Na	2,5
Gélose	1,0 à 2

Sur ce milieu, le développement du Staphylocoque serait au moins triple de ce qu'il est sur tout autre. Telle est du moins l'affirmation de SABOURAUD et NOIRÉ.

L'emploi de sucre massé revient à l'utilisation de sucre impur et il est exact que ces impuretés ont souvent un rôle très favorable. C'est ce que M. PETIT (1) a montré pour le maltose massé; ce sucre renferme du phosphore à l'état organique, et, de ce fait, il est très favorable à la nutrition des Bactéries. Mais l'urée n'est nullement indispensable dans la gélose de NOIRÉ. Le milieu de NOIRÉ nous a donné d'excellents résultats, mais les géloses bouillon sucrées nous ont donné sensiblement les mêmes résultats. Il y a un fait sur lequel Ph. LASSEUR (1913) a attiré souvent l'attention, c'est l'épaisseur de la couche nutritive. Ce facteur joue un rôle capital dans la production des corps microbiens. Ainsi, une même gélose distribuée sous 1, 2, 4, 5, 10 mm. d'épaisseur donne des résultats variables suivant la couche du milieu expérimenté. Or, même avec une épaisseur de 1 mm., la quantité de substance nutritive mise à la disposition de la bactérie est largement suffisante; de même, il est sous-entendu que les précautions sont prises pour éviter la dessiccation rapide de cette mince couche de

(1) Communication verbale.

substance nutritive. Il faut donc chercher l'explication de ce phénomène dans les propriétés particulières des gels (synérèse), c'est un point sur lequel Ph. LASSEUR reviendra bientôt et que je ne puis préciser davantage.

NOIRÉ avait en vue, avec juste raison, la production rapide des corps microbiens. SIERAKOWSKI (1922) s'est inspiré d'un autre principe; l'auteur a recherché le milieu qui permet encore la croissance du Staphylocoque, mais s'oppose à celle des autres Bactéries. Pour cela, il utilise le chlorure de sodium comme agent de séparation. On sait, depuis les travaux de MIQUEL (1882-1883), WASSERZUG (1887), STADLER (1899), GILBERT et CARNOT (1904), LAFFORGUE (1905), KARAFFA-KORBUTT (1912), COUPIN (1915), MAMELLE (1919) qu'il existe une concentration limite en NaCl au-delà de laquelle le développement de telle ou telle Bactérie est impossible. SIERAKOWSKI utilise un milieu renfermant 3 ou 5% de NaCl (1). J'ai adopté une teneur en NaCl de 3% et je prépare la gélose de la façon suivante (2) :

Gélose salée. — 500 grammes de viande de bœuf hachée; on fait macérer dans un litre d'eau pendant 12 heures. Puis on porte à l'ébullition pendant 15 minutes; on exprime et filtre. Au filtrat, on ajoute 2% de peptone et 3% de NaCl; on porte à nouveau pendant 15 minutes à l'ébullition. On neutralise au carbonate de soude en présence de

(1) Les cocci supportent en général très bien les doses de sel élevées. Ainsi, si à un milieu eau + morue, on ajoute des doses croissantes de sel même jusqu'à saturation du liquide en NaCl, on constate que la flore se restreint de plus en plus à mesure que croît la teneur en sel, mais même à saturation, les cocci continuent à se développer (LASSEUR, inédit).

(2) Le Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy utilise un milieu différent.

phénol-phtaléine. On chauffe ensuite pendant 15 minutes à l'autoclave sous vapeur fluente. On ajoute ensuite 2% de gélose; on chauffe durant 50 minutes; puis on abandonne pendant 12 heures au repos. On porte une quatrième fois le milieu à la température de 100° (autoclave), et on neutralise au CO_3Na^2 . On abandonne au repos, on décante le liquide clair et on filtre. Enfin, le milieu est réparti dans des tubes d'essais à 120° C.

Préparation des émulsions

Quel que soit le mode d'atténuation adopté, on doit toujours éviter la contamination durant l'ensemble des opérations que comporte la fabrication du vaccin. Il serait téméraire d'opérer sans précautions, sous le vain prétexte de l'action ultérieure d'un agent microbicide sur l'émulsion.

Matériel. — En outre du matériel que l'on rencontre dans tous les laboratoires de bactériologie, la préparation des vaccins exige l'emploi d'une centrifugeuse à grande puissance (10.000 tours si possible); d'un thermostat avec agitateur; de soie stérile; d'une compte-microbes de Jouan et, facultativement, d'un néphélomètre, et d'un comparateur de Walpole. Enfin, il est nécessaire d'utiliser des ampoules à fond rond, pour éviter les dépôts dans les extrémités effilées des ampoules ordinaires.

Tout ce matériel est familier au bactériologiste, je me bornerai donc à insister sur la nécessité des centrifugeurs à grande puissance.

Certains germes, notamment le Gonocoque, sont très sensibles à l'action de l'eau physiologique, il y a donc lieu

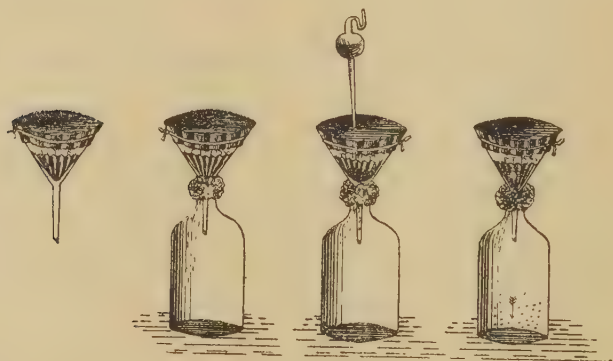
de limiter au minimum leur contact avec cette eau. Cependant, j'estime qu'il est indispensable de séparer ces germes, soit du milieu liquide où ils se sont développés, soit de l'eau physiologique qui a servi à faire la suspension lorsque la culture a été effectuée sur gélose. Or, avec les centrifugeuses à grande puissance, la séparation des germes du liquide ambiant s'effectue en quelques minutes. Il est donc possible d'éliminer la plus grande partie des albumines et peptones du milieu de culture et d'éviter ainsi des réactions protéiques n'ayant aucune relation avec la réaction vaccinale proprement dite. De plus, les germes sont d'autant plus facilement phagocytés qu'ils sont mieux débarrassés des produits de la vie microbienne.

La crainte des contaminations impose l'emploi de tubes à centrifuger munis d'un appareil de fermeture. Lorsque, pour une cause quelconque, je ne pouvais fermer les tubes à centrifuger, j'additionnais l'émulsion contenue dans le tube à centrifuger d'un peu d'éther qui formait une couche isolante à la surface de l'émulsion.

Un mot encore sur les thermostats. En général, on utilise des bains-marie à régulateur métallique. Ces appareils devraient donner une température constante, en réalité, ils fournissent des variations de température assez fortes.

Le thermostat du laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie est un bain-marie de Jouan qui a été calorifugé et muni d'un agitateur très puissant. Ce qui permet de maintenir la température constante à $2/10$ de degré près. Pour les approximations plus grandes, un régulateur spécial permet de maintenir la température constante au $1/10$ de degré près.

Mode général de préparation des émulsions. — Qu'il s'agisse de préparer un vaccin chauffé, éthéré, formolé ou iodé, il faut au préalable effectuer l'émulsion mère. A cet effet, les cultures sur gélose sont émulsionnées dans une petite quantité d'eau physiologique. On filtre sur soie stérile ou papier. Cette filtration doit être faite à l'abri des poussières de l'air. On arrive aisément à ce résultat à l'aide du dispositif suivant utilisé au Laboratoire du Professeur LASSEUR :



A l'intérieur d'un entonnoir, on dispose le papier filtre ou la soie. On recouvre l'entonnoir avec du papier filtre, puis on assujettit le papier filtre avec une ficelle, on pose l'entonnoir sur le flacon. Après avoir bouché le flacon avec de l'ouate formant un manchon autour de l'entonnoir, on stérilise le tout. Pour filtrer l'émulsion, on aspire celle-ci à l'aide d'une pipette PASTEUR, puis, d'un coup sec de la pipette, on perce le papier fermant l'entonnoir à la partie supérieure. On laisse écouler le liquide qui, après filtration, se rassemble dans le flacon où il est possible de prélever à l'aide d'une autre pipette. Par cette première filtration, on

élimine les fragments de gélose qui auraient pu être entraînés avec l'eau physiologique.

Pour les germes donnant facilement des émulsions, on filtre directement sur papier; lorsqu'il est difficile d'obtenir une émulsion un peu homogène, on filtre sur soie. Le liquide est reçu dans un flacon renfermant des germes, on agite, et l'émulsion ainsi obtenue est filtrée à nouveau sur papier filtre toujours à l'abri des poussières de l'air. L'émulsion obtenue, on centrifuge, on décante pour séparer les éléments nutritifs solubles qui ont passé dans l'eau physiologique lors du contact de cette dernière avec la gélose; après centrifugation, on décante et remet le culot de centrifugation en suspension dans l'eau physiologique. Après homogénéisation, on déterminera la richesse de la suspension en corps microbiens.

Méthode d'évaluation

de la teneur du vaccin en corps microbiens

Il n'est pas nécessaire d'injecter des quantités rigoureusement connues de corps microbiens et cela est fort heureux, car aucune des méthodes actuellement utilisées ne permet de déterminer la valeur précise des quantités de germes inoculés; c'est ce que nous allons démontrer très rapidement.

Méthode des pesées. — Dans les méthodes de pesées (1), le poids obtenu $P = p$ (corps microbiens) + p' (eau) + p'' ,

(1) Je ne crois pas devoir rappeler les méthodes de WRIGHT et LEISCHMANN qui sont actuellement complètement abandonnées des bactériologues.

(fragments de gélose), on peut évidemment enlever les petits morceaux de gélose par filtration, mais il est impossible d'éviter la seconde cause d'erreur : l'eau. Le culot de centrifugation est constitué par des corps microbiens, et, entre eux, il existe une quantité d'eau qui varie avec la valeur de la force centrifuge utilisée. Cette quantité d'eau peut être réduite, mais elle n'est jamais négligeable comparativement au poids des corps microbiens. Quant à la dessiccation, jusqu'à poids constant, elle est passible d'objections analogues. En effet, les expériences déjà anciennes de CRAMER (1895-1897) montrent que les corps microbiens absorbent facilement les sels minéraux avec lesquels ils sont en contact. Suivant le milieu de culture, la richesse en matières minérales du culot de centrifugation variera énormément et le poids réel de la substance microbienne sera fort différent.

Numération. — La numération par ensemencement sur gélose a l'inconvénient d'exiger une durée d'au moins 24 heures, et d'ailleurs, même après 24 heures, toutes les colonies ne sont pas apparentes. De plus, il n'est nullement démontré qu'une colonie ait pour origine un seul germe microbien; nous pouvons même poser qu'en principe, une colonie de Staphylocoques a, généralement, plus d'un germe à l'origine.

Les numérations à l'aide de cellule spéciales sont rapides, mais le procédé n'est pas à l'abri de toute critique.

Tout d'abord, il faut rejeter les cellules d'une profondeur supérieure au cinquantième de millimètre. Avec les cellules ayant 0,1 mm. de profondeur, les bactéries se superposent

sur de nombreux plans et une numération précise devient illusoire.

Quelle que soit la cellule utilisée, il est une objection que l'on pourra toujours faire à ce mode d'estimation de la richesse bactérienne. Supposons une émulsion constituée uniquement par des cellules rondes (a), la numération n'offre pas de difficultés, mais dans une émulsion, toutes les cellules ne seront pas au même stade de développement. Dans le cas du Staphylocoque, par exemple, l'état adulte correspond à la sphère, mais bientôt cette cellule s'allonge suivant un de ses diamètres, elle devient elliptique (b) et une cloison apparaît (c, d, e).



Peu à peu les cellules filles se séparent. Il est évident que le système (d) est plus grand que le système (a). En d'autres termes, en (a), nous avons une quantité de substance microbienne plus petite qu'en (d). A partir de quel stade devons-nous compter deux éléments ? Il y a là une cause d'erreur et le facteur personnel jouera certainement un grand rôle dans cette estimation. A côté de cette cause d'erreur difficile à compenser, il en est d'autres dont il est possible de tenir compte, fort heureusement.

En premier lieu, citons le défaut d'homogénéité de la suspension. On remédie à cet inconvénient en agitant la suspension même avec des billes de verre et en filtrant aseptiquement sur papier filtre.

Une bonne suspension donnera pour différents carrés d'une cellule convenable, des nombres de cet ordre :

1° STAPHYLOCOQUE :

7 - 8 - 6 - 7
6 - 7 - 8 - 5
7 - 8 - 6 - 7
8 - 7 - 6 - 9

2° BACILLE COLI :

10 - 11 - 10 - 13
10 - 12 - 11 - 10
11 - 10 - 12 - 10
14 - 10 - 12 - 11

Certains auteurs se plaignent que les germes se déposent d'une façon irrégulière dans les carrés, et on a proposé différents artifices afin d'obvier à cet inconvénient. En fait, ce que l'on cherche à obtenir, c'est la stabilisation des suspensions microbiennes; ce à quoi on arrive en diminuant la tension superficielle ou en augmentant la charge électrique ou la viscosité. C'est bien l'idée d'HENRIQUES (1923) lorsqu'il préconise la stabilisation à l'aide de gomme arabique.

L'emploi de la gomme arabique ne nous a pas amélioré très sensiblement les résultats dans la numération du Staphylocoque. C'est ce qui ressort des chiffres suivants :

Numération sans gomme arabique

12 - 18 - 17 - 12
11 - 7 - 13 - 8
12 - 13 - 12 - 18
12 - 15 - 16 - 18

Numération avec gomme arabique

15 - 18 - 12 - 12
10 - 12 - 12 - 16
12 - 10 - 11 - 16
14 - 14 - 18 - 12

Le Staphylocoque formant naturellement de petits amas qu'il est assez difficile de résoudre, on peut objecter que ce microorganisme ne constitue pas un matériel de choix

pour des recherches de ce genre. Mais, avec le Colibacille, on obtient des résultats analogues.

L'addition de gomme arabique ou de gélatine n'améliore pas d'une façon bien sensible les résultats obtenus, mais, dans tous les cas, ne complique certainement pas les lectures. Or, ce n'est pas le cas de certaines substances qui, loin de disperser les éléments bactériens les précipitent, au contraire. Les alcalins favoriseraient la dispersion des germes, mais l'attaque du verre de la cellule s'oppose à leur emploi.

La numération peut être effectuée avec des germes non colorés, cependant, quelquefois, il peut être commode de colorer légèrement les corps microbiens. A cet effet, on emploiera le bleu de méthylène dilué pour le Staphylocoque, et le bleu de Roux pour le Colibacille, le Proteus.

Le colorant utilisé ne doit pas précipiter au contact de l'émulsion et il ne doit pas agglutiner les corps microbiens. Enfin, il ne doit que très légèrement colorer le plastide bactérien afin que l'on puisse reconnaître l'organisation du Coccus (cytoplasme, membrane), et ne pas le confondre avec un grain de colorant précipité accidentellement. Je n'ai pas l'intention de passer en revue toutes les causes d'erreur (bulle d'air, lamelle ou cellule grasses, etc...), mais je tiens à montrer les différences de résultat que peuvent fournir deux cellules de profondeur différente, la cellule de THOMA et la cellule de JOUAN. Cependant, avant d'indiquer les résultats que j'ai obtenus, il me paraît intéressant de donner une courte description de la cellule construite par M. JOUAN (Paris).

La cellule de JOUAN est basée sur le même principe que la chambre ou compte-globules de MALASSEZ. La chambre

graduée est enchassée dans une lame métallique. L'épaisseur est réglée par trois vis qui font saillie et sur lesquelles la lamelle vient s'appuyer. On détermine ainsi une cellule dont la profondeur est 0 mm. 02, soit un cinquantième de millimètre. Le contact de la lamelle avec les trois points est assuré par le compresseur. On ne risque donc pas d'avoir des épaisseurs de liquide variables qui peuvent, pour une cause quelconque augmenter considérablement la valeur de la cellule et, par suite, fausser les lectures.

Le quadrillage du compte-microbes de JOUAN est le même que pour le compte-globules de THOMA, chaque carré a 1/20 de mm. de côté, soit une surface de 1/400 de mm²; la profondeur étant de 0 mm 02, le volume est de un vingt-millième de mm³.

Dans toutes mes numérations, j'ai compté les germes dans 80 ou 160 petits carrés (carré de un vingt-millième de mm³), et c'est parce que j'ai opéré sur un grand nombre de carrés que j'attache une certaine valeur aux nombres que je vais indiquer :

Emulsion bactérienne	N ^{os} des échantillons d'une même émulsion	Quantités de germes au cm ³	
		(au cm ³) trouvés à l'aide de la cellule de Jouan :	(au cm ³) trouvés à l'aide de la cellule Thoma Zeiss.
Emulsion de Staphylocoques 1 milliard par cm ³	I	980.000.000	1.080.000.000
	II	1.040.000.000	960.000.000
	III	980.000.000	840.000.000
Emulsion de Colibacilles 1 milliard par cm ³	I	1.070.000.000	866.000.000
	II	990.000.000	940.000.000
	III	960.000.000	890.000.000
Emulsion de B. proteus 1 milliard au cm ³	I	1.010.000.000	830.000.000
	II	1.050.000.000	1.180.000.000
	III	960.000.000	1.200.000.000

Incontestablement, le compte-globules de JOUAN donne des écarts moindres que la cellule de THOMA-ZEISS.

Au point de vue pratique, la numération des germes par le compte-globules de JOUAN, sous réserve des précautions d'usage à observer, fournit des résultats suffisamment approchés.

On a cherché des techniques plus rapides d'estimation de la richesse des vaccins en corps microbiens et on s'est adressé aux procédés néphélémétriques. La néphélémétrie introduite tout d'abord dans la chimie analytique avait été rapidement abandonnée, lorsque les travaux de LORD RAYLEIGH (1) lui donnèrent un regain d'actualité.

KLEINMANN a remarqué qu'il existe un rapport direct entre les intensités lumineuses et la concentration de deux milieux troubles à la condition *expresse que la grandeur de ces particules soit la même*. A l'aide de la néphélémétrie, on peut donc espérer déterminer avec une approximation suffisante la densité microbienne.

Parmi les appareils que l'on peut utiliser, nous citerons ceux de DIENERT, VLÉS et VERNES.

Les mesures effectuées à l'aide de l'appareil de VERNES montrent à quel degré d'approximation il est possible d'arriver. On peut percevoir des variations de 100 millions pour des concentrations de l'ordre du milliard; par contre, des variations de 25 à 50 millions ne sont nettement perceptibles qu'avec des suspensions de 500 millions, ainsi qu'en témoignent les nombreuses mesures que j'ai effectuées.

Il est bien entendu que les mesures ne doivent être faites que sur les émulsions rigoureusement débarrassées

(1) COMPAN et MECXLENBURG, CHÉNEVEAU et AUDUBERT, EHRENSHAFT, MUELLER.

de milieu nutritif. On sait, en effet, qu'avec des émulsions mal lavées, le trouble peut varier de 1 à 156, alors que le nombre des microbes n'a varié que de 1 à 30 (LE MOIGNIC et SÉZARY (1918).

De plus, la proportionnalité directe ne s'observant qu'avec des particules de même grandeur, il est indispensable de ne comparer entre elles que des émulsions d'une même espèce bactérienne. C'est ce qui ressort d'ailleurs de l'examen des nombres suivants :

Emulsions offrant le même trouble :

Richesse en corps microbiens (numérés)	Colibacille (vivant) : 2 milliards Staphylocoque (vivant) : 3 milliards 250
--	--

En ramenant les mesures néphélométriques à la valeur des mesures colorimétriques, les travaux de KLEINMANN m'ont suggéré l'idée de déterminer la richesse microbienne des émulsions à l'aide du comparateur de WALPOLE.

J'indique dans le tableau ci-dessous les chiffres trouvés dans l'évaluation comparative des germes microbiens à l'aide de la cellule de JOUAN et du comparateur de WALPOLE.

Nos d'expé- rience	Désignation des émulsions :	Nombre de germes au cm ³ trouvés avec	
		Le comparateur de Walpole	La cellule de Jouan
1	Colibacilles (vivants)	2 milliards 5..	2 milliards 28..
2	Colibacilles (vivants)	750 millions	900 millions.
3	Staphylocoques (vivants)	1 milliards 5..	1 milliard 24..
4	Staphylocoques (vivants)	2 milliards	1 milliard 2..
5	Staphylocoques (iodés)	1 milliard 5..	1 milliard 32..

La sensibilité de la méthode varie avec l'intensité du trouble, ainsi pour des troubles de l'ordre du milliard, l'œil n'apprécie pas des variations inférieures à 200 millions, tandis que pour des concentrations faibles (exemple : 100 millions), l'œil perçoit des variations de 50 millions. Enfin, le facteur personnel joue un rôle très important, certains opérateurs apprécient des variations de 25 millions et même des variations plus faibles.

En résumé, l'évaluation de la richesse microbienne d'un vaccin s'effectue aisément et avec une approximation suffisante avec la cellule de JOUAN. Les procédés néphélémétriques peuvent aussi rendre de grands services.

•

DEUXIÈME PARTIE

I. — ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DU STAPHYLOCOQUE AVANT ET APRÈS L'ACTION DES AGENTS D'ATTÉNUATION

A) EXAMEN MICROSCOPIQUE AVANT L'ATTÉNUATION

Aspect en culture

Mode de groupement. — En goutte pendante, le Staphylocoque se présente sous l'aspect de Cocci isolés, de diplocoques, de tétrades, et le plus souvent, en amas de taille et de forme très différentes. Quelquefois, on observe de très courtes chainettes dont la formation s'explique par ce fait que la division s'effectue plusieurs fois dans des plans parallèles au lieu de s'effectuer dans des plans perpendiculaires.

Dans le cycle évolutif de l'un de ces plastides bactériens, nous avons les phases successives : élément rond  élément elliptique  apparition de la cloison  la cloison transversale se gélifie  deux cellules filles.

Or, les deux cellules filles se divisent à leur tour et le plus souvent la division continue, parfois, elle s'arrête au stade tétrade par rapport aux autres formes. C'est ce que j'ai tenté de mettre en évidence dans le tableau suivant :

Tableau I. — Fréquence des tétrades :

Race de Staphylocoques	Cultures de		
	24 heures	48 heures	72 heures
Race A	% 42	55	72
Race B	% 30	64	68

Dans les tétrades, les éléments sont plus gros que les éléments isolés, ou réunis en diplocoques ou en amas; de plus, les formes en tétrade sont moins réfringentes que les autres et se colorent plus difficilement que les éléments isolés. Aussi, dans la préparation des vaccins, j'estime que l'on doit donner la préférence aux cultures de 18 à 24 heures.

Structure. — L'emploi du bleu de méthylène ou du bleu de toluidine en solution aqueuse diluée permet de constater, chez le Staphylocoque, la présence d'un grain chromatique que je compare à un noyau. La membrane est toujours très nettement visible lorsque l'on emploie des colorants très dilués.

La fuchsine formolée au 1/10 colore la membrane en rouge et le cytoplasme en rose. Le noyau n'est pas coloré.

Les détails de structure se perçoivent beaucoup plus facilement lorsque l'on utilise la méthode fuchsine-formolée, encre de Chine de LASSEUR (1920).

La suspension de Staphylocoques est traitée par la fuchsine-formolée durant 5 minutes. On centrifuge et on décante

le liquide surnageant. On ramène au volume primitif avec de l'eau distillée. Une goutte de la suspension est additionnée d'une goutte d'encre de Chine préparée suivant la technique indiquée par LASSEUR. On examine à l'aide d'objectif à sec, puis à l'immersion.

Les recherches faites suivant cette technique avaient surtout pour but l'étude de l'intégrité de la cellule. Aussi ai-je attaché une importance toute particulière à l'étude de la colorabilité. La colorabilité étant sous la dépendance de la perméabilité de la membrane et de l'état physico-chimique du protoplasme, j'ai étudié successivement l'action du bleu de méthylène, du bleu de toluidine, du Gram; IKI, IKI + bleu de méthylène, de la fuchsine, de la vésuvine, du rouge neutre, sur les Staphylocoques, avant toute atténuation.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant (1) :

Tableau II.

Nos d'expé- rience	Désignation des colorants	Colorabilité du matériel après		
		Fixation alcool éther	Fixation à la flamme	Observation
1	Bleu de Méthylène	4	4	
2	Bleu de Toluidine	4	4	
3	Gram	3	3	positif
4	Iode-Lugol	2	2	
5	Iode-Lugol + Bleu de Méthylène	3	3	
6	Fuchsine	2	2	
7	Vésuvine	3	3	
8	Méthyl-violet	3	3	
9	Neutral-roth	3	3	

(1) Dans ce tableau, l'intensité des colorations est exprimée par des chiffres variant de 2 à 4.

Dans ces recherches, les souches A et B ont donné les mêmes résultats, aussi je ne fais figurer, dans le tableau ci-dessus, que les valeurs relatives à la race A.

B) EXAMEN MICROSCOPIQUE APRÈS L'ATTÉNUATION

Morphologie des germes chauffés

Première série d'essais. — Dans une première série d'essais (Tabl. III), les germes ont été chauffés à 56° C, durant 2 heures, ou 3 heures, ou 4 heures, etc... Dans ces recherches, le rouge neutre colore avec la même intensité tous les plastides. IKI se comporte de la même façon, il en est de même du bleu de méthylène IKI. En sorte que dans le tableau récapitulatif suivant, je ne mentionne pas l'action de ces colorants. Par contre, les différents plastides réagissent de façon différente vis-à-vis du bleu de toluidine. Le bleu de méthylène donnant les mêmes résultats que le bleu de toluidine, je n'indiquerai que les résultats obtenus avec ce dernier colorant.

Les essais ont porté sur les deux souches A et B, mais les deux souches ayant toujours donné les mêmes résultats (bien qu'il s'agisse de cultures différentes), je mentionne les résultats sous la rubrique souches A et B. Dans un même but de simplification, j'ai réuni les résultats donnés par les deux modes de fixation, lorsque ces résultats sont identiques.

Tableau III. — Action de la chaleur (1)

Nos d'expé- rience	Tempé- ratures	Durées du chauffage	Races	Refrin- gence	Bleu de Tolui- dine	Gram	Fuch- sine	Vésu- vine
1	56°	2 heures	A et B	4	4	3	2	3
2	56°	3	—	3	4	2	2	3
3	56°	4	—	3	4	2	2	3
4	56°	9	—	2	3	2	3	3
5	63°	1	—	2	3	1	3	2
6	75°	1/2	—	3	4	2	2	3
7	80°	1/2	—	2	3	2	2	2

Deuxième série d'essais. — Dans la seconde série d'expériences (tableau IV), la vésuvine, le rouge neutre ont coloré tous les germes avec la même intensité. De plus, le bleu de toluidine s'est comporté comme le bleu de méthylène, aussi, me suis-je limité, dans le tableau suivant, à l'énumération des résultats obtenus avec le bleu de méthylène, le Gram I K I, et la fuchsine.

Tableau IV. — Action de la chaleur (2).

Nos d'expé- rience	Tempé- ratures	Durées du chauffage	Races	Refrin- gence	Bleu de méthy- lène	Gram	Iode Lugol	Fus- chine
1	56°	30'	A et B	4	4	3	2	2
2	56°	60'	—	3	4	3	2	2
3	56°	90'	—	2	3	2	2	3
4	56°	120'	—	2	2	1	2	3
5	58°	30'	—	3	4	3	2	2
6	60°	30'	—	3	4	3	2	2
7	62°	30'	—	2	4	3	2	2
8	62°	45'	—	2	3	3	2	2
9	64°	30'	—	3	3	3	2	2
10	64°	45'	—	2	3	3	2	3
11	66°	30'	—	2	3	3	2	2
12	66°	45'	—	2	2	2	2	3

(1) Dans ce tableau l'intensité des colorations est exprimée par des chiffres variant de 1 à 4.

(2) Même remarque que pour le tableau III.

Il résulte de l'examen des tableaux III et IV, que par le chauffage à 56° C, la réfringence diminue à partir de l'expérience 2 et s'accroît dans l'expérience 4. Il est aussi à remarquer qu'un chauffage de 30' à 72° n'est pas aussi actif qu'un chauffage de 9 heures à 56°. Tandis que le bleu de méthylène n'accuse une diminution de la colorabilité qu'à partir de l'expérience 4 (9 heures de chauffage), le Gram montre une chute de la colorabilité dès 3 heures de chauffage à 56°.

Le chauffage à 56° durant 9 heures détermine des modifications profondes du plastide bactérien qui augmente de volume par imbibition, l'action de l'eau va jusqu'à la lyse plus ou moins complète de la cellule. Il est à remarquer que même à basse température (56° C), le *chauffage prolongé détermine des altérations graves du plastide bactérien*. Or, ce fait est important, car il n'était pas vraisemblable a priori. En effet, l'action de la température sur la vitesse des réactions n'est pas directement proportionnelle, mais suit une exponentielle.

Examen morphologique des germes traités par l'éther, l'iode et le formol

Si nous nous en tenons rigoureusement à l'aspect microscopique comme test d'évaluation de la valeur d'une méthode, la chaleur ne nous paraîtrait pas un agent d'atténuation bien recommandable. Examinons donc ce que l'on obtient avec les agents chimiques tels que : l'éther, l'iode et le formol.

L'éther éthylique offre l'avantage de ne pas modifier l'état morphologique : aspect, colorabilité, réfringence, ainsi qu'on le constate par l'examen du tableau V.

Tableau V. — Action de l'éther (1).

Nos d'expé- riences	Durées de l'action de l'éther	Races	Réfrin- gence	Bleu de méthy- lène	Gram	Lugol	Iode lugol + bleu de méthy- lène	Fuch- sine
1	1/2 h.	A et B	4	3	2	2	2	2
2	1 heure	—	3	3	2	2	2	3
3	2 —	—	3	3	2	2	2	3
4	4 —	—	3	3	2	2	2	3
5	6 —	—	3	3	2	2	2	3
6	12 —	—	3	3	3	2	2	4
7	24 —	—	2	2	3	2	2	4

J'ai résumé dans le tableau VI, l'action de l'iode sur les deux races A et B.

Tableau VI. — Action de l'iode (2).

Nos d'ex- périence	Durées de l'action de l'iode	Races	Refrin- gence	Bleu de méthylène	Gram	Rouge neutre
1	20'	A et B	3	3	3	3
2	30'	—	3	3	3	3
3	45'	—	3	3	3	3
4	60'	—	3	3	3	3
5	90'	—	3	3	3	3

En résumé, sous l'action de l'iode, la colorabilité par le bleu de méthylène est diminuée, mais, par contre, elle est augmentée vis-à-vis de la fuchsine. La bactérie perdrait donc un peu de sa propriété nucléaire sous l'action de l'iode.

(1) Même remarque que pour les tableaux précédents.

(2) *Id.*

Action du formol

En ce qui concerne le formol, j'arrive aux mêmes conclusions que celles formulées par COSTA (1922). A l'examen microscopique, il est difficile, sinon impossible, de différencier un plastide fixé par le formol d'un plastide vivant.

CONCLUSIONS :

En utilisant l'aspect microscopique comme criterium d'évaluation des méthodes d'atténuation, on obtiendrait le classement suivant : 1° éther, formol *ex-aequo*; 2° iode; 3° chaleur.

II. — ETUDE

DES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

SOUS L'ACTION DES AGENTS

PHYSICO-CHIMIQUES

Nous venons de voir que les agents physiques et chimiques déterminent, dans certaines conditions, des modifications morphologiques du plastide bactérien. Etudions maintenant les modifications physiologiques déterminées par l'action de ces mêmes agents.

Il est impossible d'introduire de grandes quantités de germes vivants dans l'organisme. L'emploi des doses extrêmement faible ne donne pas non plus la certitude d'inocuité absolue, aussi a-t-on préféré inoculer des doses moyennes ou fortes de germes à vitalité diminuée. En général, on utilise des germes morts, mais, en fait, on pourrait se contenter de germes dont la vitalité serait suffisamment ébranlée pour qu'ils puissent être la proie facile des phagocytes. En opérant ainsi, on ne court pas trop les risques de l'infection et le pouvoir immunogène des corps microbiens reste très élevé, certainement plus élevé que celui des germes tués. Malheureusement pour être faible, le risque d'infection

existe toujours et l'immense majorité des opérateurs préfèrent utiliser (chez l'homme) des germes tués; chez les animaux (sauf le cas d'animaux de grande valeur), on donne toujours la préférence aux germes à vitalité ralentie, à virulence atténuée.

Quel que soit l'agent d'atténuation utilisé, on constatera donc toute une gamme de modifications avant d'arriver à la mort de la cellule et nous allons successivement étudier ces modifications dues à l'action de la chaleur, de l'iode, du formol et de l'éther.

A. — *Action de la température*

Nous savons que la chaleur n'intervient que pour augmenter la vitesse des réactions, par suite, il peut paraître indifférent de chauffer des corps microbiens à une température t durant un temps T ou de les porter à la température T durant un temps t . Or, rien n'est moins démontré. On sait, en effet, que l'action de la température peut être représentée assez bien par l'équation bien connue d'ARRHÉNIUS :

$$\frac{K_1}{K_2} = e^{\frac{\mu}{R} \left(\frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2} \right)}$$

C'est, en effet, ce que nous observons dans la destruction, par la chaleur, des spores charbonneuses et dans celle de l'antitoxine diphtérique (MADSEN et NYMANN, (1917); MADSEN et WALBUM, (1917)).

Dans mes recherches sur le Staphylocoque, l'expérimentation a porté sur des émulsions qui ont toutes été amenées à la concentration de 500 millions au cm^3 . L'émulsion était chauffée à une température t durant un temps déterminé. Puis l'émulsion était immédiatement refroidie. On prélevait alors une quantité de liquide renfermant 100.000 germes et on les ensemençait sur boîte de Pétri (gélose salée à 3 %). La numération des colonies avait lieu durant 10 jours consécutifs.

Les expériences ont porté sur les souches A et B de Staphylocoque; toutes les expériences ont été faites en double.

Dans le chauffage à 56° , durant 2 heures, le nombre des colonies est si considérable que j'ai renoncé à la numération. Après 3 heures de chauffage à 56° , on n'obtient pas une colonie, tous les germes sont tués. Même résultat après 1 heure de chauffage à 63°C .

Dans une deuxième série d'expériences, les émulsions chauffées sont ensemencées sur gélose salée à 0,5% (milieu I) et sur gélose salée à 3 %, (milieu II). Pour ne pas compliquer le tableau, je ne ferai figurer que les valeurs relatives au deuxième et au dixième jours.

Tout d'abord, le chauffage à 56° durant 30 minutes donne un nombre considérable de colonies, de même après 60 minutes. Par contre, après 90 minutes, on n'obtient plus que de une à sept colonies. Le chauffage à 56° durant 120 minutes, a détruit tous les germes. J'indique ci-dessous les résultats obtenus avec les températures de 58° , 60° , 62° , etc...

N ^{os}	Tempé- ratures	Durées du chauffage	Races	Milieu de culture	Nombre de Colonies après	
					24 heures	10 jours
1	58°	30'	A	I	48	50
2	»	»	»	II	65	80
3	»	»	B	I	60	60
4	»	»	»	II	54	64
5	60°	30'	A	I	62	66
6	»	»	»	II	68	70
7	»	»	B	I	46	46
8	»	»	»	II	57	60
9	62°	30'	A	I	20	20
10	»	»	»	II	12	12
11	»	»	B	I	30	30
12	»	»	»	II	21	24
13	62°	45'	A	I	10	12
14	»	»	»	II	8	10
15	»	»	B	I	4	4
16	»	»	»	II	6	6
17	64°	30'	A	I	20	20
18	»	»	»	II	20	28
19	»	»	B	I	15	15
20	»	»	»	II	3	3
21	64°	45'	A	I	7	7
22	»	»	»	II	1	5
23	»	»	B	I	0	1
24	»	»	»	II	0	3
25	66°	30'	A	} Tous les germes ont été tués		
26	»	»	»			
27	»	»	B			
28	»	»	»			
29	66°	45'	A			
30	»	»	»			
31	»	»	B			
31	»	»	»			

Il résulte de ces expériences que :

1° Le chauffage à 60°, 62°, 64° C, durant 30 ou 45 minutes, est insuffisant pour détruire la totalité des germes microbiens.

2° Les races A et B offrent des résistances voisines mais cependant nettement différentes. Ces manières de se comporter différemment vis-à-vis d'un agent physique sont complètement en harmonie avec l'idée de biotypes divers et par suite de formes pouvant offrir des différences dans l'intensité des réactions anticorps.

3° Dans la majorité des expériences, le milieu II (salé à 3 %) s'est montré supérieur au milieu I. Cependant, à mesure que la température augmentait, le milieu I devenait de plus en plus favorable. Ce fait peut s'expliquer de la façon suivante : LASSEUR a montré qu'une culture est constituée par des biotypes dont l'ensemble imprime son cachet à la culture. Or, l'action de températures successivement croissantes peut isoler une série de biotypes dont les uns se développent mieux sur milieux salés à 3 % et dont les autres sont le mieux adaptés aux milieux salés à 0,5 %.

Avant d'aller plus loin, disons deux mots de cette singularité, le milieu II salé à 3% paraissant plus nutritif que le milieu I salé à 0,5 %, on conçoit que l'addition de doses croissantes de NaCl s'oppose au développement de certains germes, mais on comprend plus difficilement qu'une addition de 3 % de NaCl puisse favoriser la végétation de certains types de Staphylocoque. Il est bien évident que NaCl n'agit pas en qualité d'élément nutritif, car des doses infiniment moindres de NaCl suffisent aux exigences de la nutrition bactérienne. NaCl agit-il par ses impuretés ⁽¹⁾ ? C'est un point qui n'est pas élucidé.

(1) Ou bien détermine-t-il des modifications importantes dans la structure du gel ?

B. — *Action de l'iode*

L'emploi de l'iode comme agent d'atténuation est déjà ancien. Pour pouvoir injecter des doses relativement élevées de toxine diphtérique ou tétanique, on additionnait la toxine soluble étudiée d'une quantité convenable d'iode.

L'iode qui donnait d'excellents résultats dans la préparation des antitoxines utilisant des toxines solubles devait, à priori, donner de bons résultats dans la fabrication des vaccins [RANQUE et SENEZ (1920)] qui emploient en dernière analyse des toxines solides ou endotoxines.

L'iode doit être utilisé de telle façon qu'il mette à l'abri de toute septicémie ou de lésions locales en assurant la mort des germes, et, de plus, il est désirable qu'il puisse déterminer une atténuation de l'endotoxine dans le but de réduire ainsi les réactions locales, focales et générales.

La solution d'iode est employée sous forme de solution iodo-iodurée :

I	1 gr.
KI	2 —
Eau	200 —

Nous rappelons à ce sujet que l'iode, qui peut exister sous la forme I , I^2 et I^3 , est sous la forme d'ion complexe I^3 dans la solution iodo-iodurée et qu'une autre solution ne peut pas, à priori, remplacer la solution de Lugol. Outre le point de vue pratique de l'atténuation, il pouvait être intéressant d'essayer d'établir le mécanisme de fixation de l'iode par les plastides bactériens. L'action bactéricide de l'iode est bien connue, mais il ne semble pas que les expé-

rimentateurs aient cherché à déterminer la nature de ce mécanisme d'action. C'est un point sur lequel je reviendrai ultérieurement. Pour l'instant, je me borne à l'étude du pouvoir microbicide de l'iode.

L'action antiseptique de l'iode peut être envisagée de façon différente. On peut utiliser des quantités constantes d'iode et faire varier le temps d'action ou faire agir des quantités variables d'iode durant un même temps. Examinons rapidement ce qui se passe dans les deux cas.

Lorsque l'on emploie un excès d'iode, la mort du plastide bactérien est très rapide et, au bout de 20 minutes d'action, on obtient aussi bien la stérilisation qu'après 60 minutes.

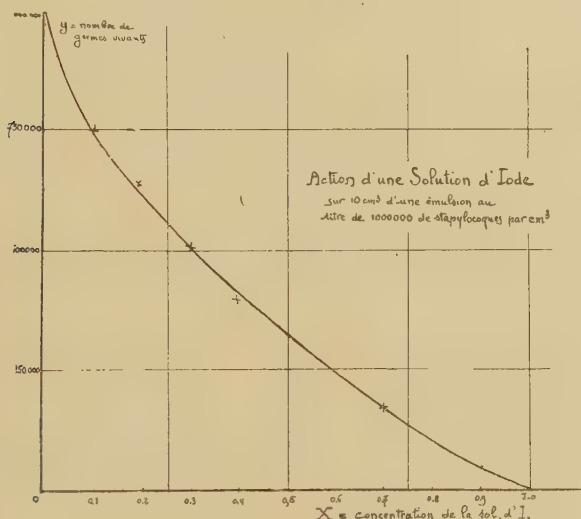
Dans l'action de la chaleur, nous avons noté une différence de résistance entre les deux races A et B de *Staphylocoque*; nous observons le même phénomène avec l'iode. La race A est la plus résistante.

Limitons maintenant à 15 minutes, la durée d'action de l'iode, mais employons des doses croissantes d'iode et nous obtiendrons les résultats suivants :

N ^{os} d'expérience	Quantités de Lugol	Quantités de germes vivants après l'action de l'iode (1)
1	1 cm ³	0
2	0,8	23.925
3	0,6	360.000
4	0,4	400.000
5	0,2	616.000
6	0,1	620.000
7	0	850.000

(1) La quantité de germes vivants est déterminée par ensemencement sur gélose. Numération après 5 jours, à 37° C.

Si on tente une représentation graphique du phénomène, l'établissement de la courbe montre que le nombre 360.000 doit être entaché d'erreur. Quoiqu'il en soit, et ainsi qu'il fallait s'y attendre, la quantité de germes détruits est fonction de la concentration, mais il n'y a pas de proportionnalité directe.



Voyons maintenant s'il nous est possible de préciser le mécanisme d'action de l'iode. Dans les recherches de ce genre, on a toujours intérêt à procéder par analogie, aussi rappellerais-je rapidement les principaux travaux effectués dans cet ordre d'idée.

H. MORAVITZ (1908) a étudié la fixation du sublimé par les globules rouges. R. O. HERZOG et BETZ ont étudié la fixation du chloroforme, du nitrate d'argent, du formol par la levure. ABDERHALDEN et PREGL (1905),

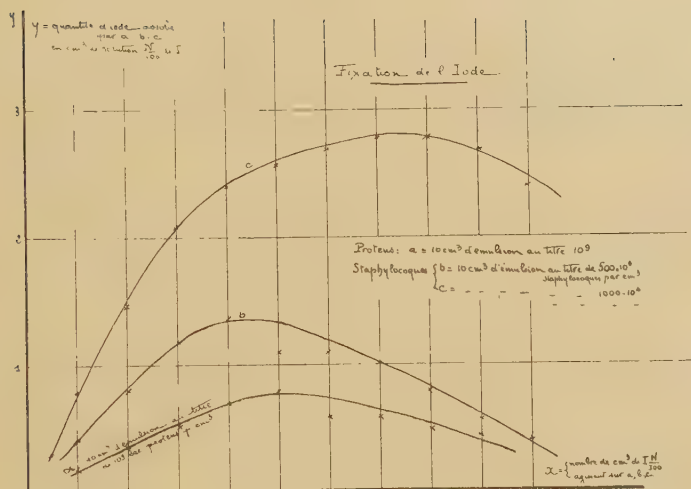
KUTSCHER ont expérimenté avec les acides aminés, les peptides et les globules rouges. LASSEUR et SPILLMANN (1921) ont décrit la fixation du rouge neutre par les plastides bactériens. Il résulte de toutes ces expériences que, *dans tous les cas, il y a eu adsorption, sauf dans la fixation du formol par la levure. Une même quantité de levure fixe toujours une même quantité de formol quelle que soit la concentration des solutions utilisées.*

Nous savons que dans l'absorption, la marche du phénomène peut être représentée par la formule de FREUNDLICH :

$$\frac{x}{m} = K C^{\frac{1}{p}} \text{ dans laquelle en faisant } \frac{x}{m} = 1 \text{ on a : } C_1 = K C_2^{\frac{1}{p}}$$

En recherchant dans quelle mesure la fixation de l'iode par les bactéries peut être représentée par la formule de FREUNDLICH, nous préciserons le rôle de l'adsorption dans cette fixation de l'halogène.

A cet effet, des prises successives de 10 cm³ d'une même émulsion, renfermant 10 millions de germes au cm³ ont été additionnées de doses croissantes d'une solution d'iode N/100. Après un contact de 10 minutes, j'ai centrifugé et décanté le liquide surnageant, puis j'ai titré l'iode resté libre dans le liquide décanté. Chaque opération a été effectuée en triple. De plus, chaque expérience comportait un témoin (eau physiologique + iode) dans lequel l'iode était titré. Les résultats obtenus sont rapportés par la courbe ci-dessous.



L'examen de la courbe montre :

1° Que la quantité d'iode fixé croît avec la concentration ;

2° Qu'il existe un maximum au-delà duquel la quantité absolue d'iode fixé diminue ;

3° On observe le même phénomène lorsque l'on utilise une suspension renfermant 500 millions de germes au lieu de 10 milliards ;

4° Le Bacille Proteus se comporte comme le Staphylocoque.

Ce maximum dans l'adsorption est assez fréquent dans les processus biologiques (LASSEUR et SPILLMANN), il n'y a donc rien de surprenant qu'il puisse être observé ici. La fixation de l'iode par les plastides bactériens se rattache donc aux phénomènes d'adsorption.

Les courbes représentées ont été obtenues à l'aide d'émulsions lavées.

Les émulsions non lavées fixent une quantité d'iode plus grande que les émulsions lavées à l'eau physiologique ou à l'eau distillée, ainsi que le montre le tableau suivant :

	<i>Iode fixé.</i>
Emulsion effectuée en solution salée (0,9 % de NaCl)....	2,2
Emulsion faite en solution salée (0,9 % de NaCl) mais lavée deux fois	0,92
Emulsion lavée et effectuée dans l'eau distillée.....	0,92

La fixation d'une plus grande quantité d'iode par les émulsions non lavées que celle fixée par les émulsions lavées est un point important dont il faut tenir compte dans la préparation des vaccins.

C. — *Action du formol*

Par la simplicité de la technique plus que par les résultats thérapeutiques, les vaccins formolés ont conquis les suffrages du corps médical. Il est vrai que pour WIDAL et SICARD, COSTA, etc... le formol tue la cellule bactérienne sans la modifier, il respecte son intégrité, il constitue un véritable « embaumement ». COSTA (1922) rappelle les propriétés microbicides du formol : « En 2 heures, à la dose de 5%, il détruit les spores et il s'oppose à toute germination au titre de 1/2000 (NICOLLE). Des tubes de bouillon formolé à 1/3000 abandonnés sans être bouchés dans le laboratoire restent clairs. Le temps nécessaire à la stérilisation dépend du titre de la solution, de la nature de la culture, et de la richesse en germes. Les spores manifestent naturellement une plus grande résistance que les corps microbiens. Certaines races de Staphylocoques se

comportent à peu près comme les spores ». J'ai tenté de vérifier ces assertions dans les expériences suivantes.

Avant d'indiquer les résultats auxquels je suis arrivé, il me paraît nécessaire de préciser certains points de technique :

1° *Titration des échantillons du formol du commerce :*

La teneur en formaldéhyde a été déterminée par le procédé indiqué au Codex.

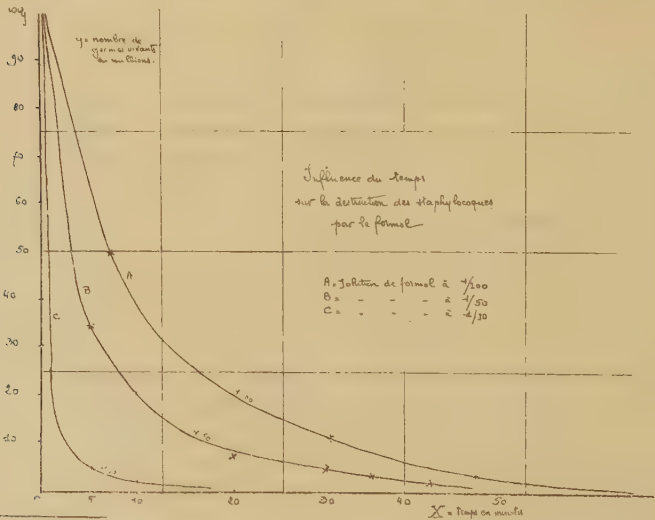
Quatre échantillons de formol commercial ont offert des richesses variant de 32,23 à 47,42%. Les solutions de teneur supérieure à 40% ont été diluées jusqu'à obtention de ce titre et c'est avec des solutions ainsi rectifiées que j'ai effectué mes recherches.

L'émulsion bactérienne a été amenée au titre de 100 millions de germes par cm^3 . On prélève une série d'échantillons de cette émulsion auxquels on ajoute des quantités de formol (à 40%) suffisantes pour que les échantillons soient formolés respectivement à : 1/10 ; 1/50 ; 1/100. La durée de l'action du formol est de : 5 ; 10 ; 20 ; 30 minutes pour les mélanges formolés au 1/10, et de 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 ; 45 ; 60 minutes pour les émulsions formolées au 1/50, et enfin, à 15 ; 30 ; 45 et 60 minutes pour les échantillons formolés au 1/100. Après le temps de contact adopté, les émulsions sont centrifugées 3 minutes à 10.000 tours. On décante le liquide surnageant et on remet les corps microbiens en suspension dans l'eau physiologique. On homogénéise avec soin et dilue au 1/10 ; 1/100..... 1/100.000, on ensemence sur boîte de Pétri à 37° C. La numération des colonies est effectuée le cinquième jour (1).

(1) Avant l'action du formol, chaque cm^3 renfermait 100 millions de germes vivants.

Nos d'expérience	Dilutions du Formol	Temps d'action du formol	Nombres moyens de Staphylocoques vivants dans 1 cm ³ (1)
1	1/10	5 minutes	42.700
2	»	10 —	180
3	»	20 —	—
4	»	30 —	—
5	1/50	5 —	33.000.000
6	»	10 —	19.000.000
7	»	15 —	15.500.000
8	»	20 —	5.740.000
9	»	25 —	4.900.000
10	»	30 —	3.810.000
11	»	45 —	320.750
12	»	60 —	218.533
13	1/100	15 —	26.080.006
14	»	30 —	6.625.000
15	»	45 —	3.301.750
16	»	60 —	2.582.800

Les courbes permettant de représenter la marche du phénomène se rapprochent de celles obtenues par MADSEN et NYMANN, dans la destruction des spores par le sublimé.



(1) Avant l'action du formol, chaque cm³ renfermait 100 millions de germes vivants.

Le fait le plus saillant, c'est cette résistance si différente des germes à l'action destructive du formol. Les résistances différentes à l'action d'un antiseptique est un fait bien connu. Mais, quelle interprétation peut-on donner de ce fait ? LASSEUR en donne l'explication inédite suivante. Lorsque l'on étudie la valeur de K dans la désinfection, on sait que la marche du phénomène peut être représentée par

l'équation connue : $\frac{d x}{d t} = K (a-x)$, dans laquelle x = la

quantité de germes tués à un instant donné t , a = la quantité de germe initiale ; $a - x$ = quantité de germes vivant au temps t , ainsi, on s'aperçoit que les plastides staphylococciques, tout comme les spores charbonneuses dans les expériences de MADSEN et NYMANN, offrent des résistances inégales. Mais, il est possible de grouper les plastides bactériens autour de différents types de résistance moyenne, et on a ainsi toute une série de biotypes B ; B_1 ; B_2 ; B_3 ; dont l'ensemble constituera ce que nous appelons l'espèce ou tout simplement la forme bactérienne. On observe des faits analogues, ajoute LASSEUR, lorsque l'on recherche une relation entre la longueur et la largeur du plastide bactérien.

La différence de résistance des germes d'une même culture est encore bien plus accusée lorsque l'on s'adresse à deux souches d'une même espèce.

C'est ce qui ressort du tableau suivant :

Souches	Emulsion formolée au 1/50, temps d'action 30 minutes	
	Colonies après	
	3 jours	10 jours
A	14	75
B	0	0

Au point de vue de la pratique des vaccins, nous résumerons ainsi nos conclusions :

1^o L'action du formol dépend de la concentration en formaldéhyde, de la durée d'action du formol et de la teneur de la suspension en germes microbiens ;

2^o Dans la préparation des vaccins staphylococciques de titre de 1 milliard de germes, il faut utiliser le formol à la concentration de 1/10 et prolonger le contact formol — corps bactériens, durant 20 minutes.

D. — *Action de l'éther*

Pour déterminer le pouvoir antiseptique de l'éther vis-à-vis du Staphylocoque, j'ai utilisé les modes opératoires suivants :

1^o L'émulsion de Staphylocoques est lavée, puis centrifugée. Le culot de centrifugation est soumis à l'action de l'éther durant 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 et 240 minutes. Puis l'éther est décanté et on en chasse les dernières traces par le séjour à l'étuve. Après ce séjour (2 heures environ), les plastides sont émulsionnés dans de l'eau physiologique et ramenés au titre de 1 milliard par centimètre cube.

Après dilution convenable, on ensemence sur gélose et on cultive à la température de 37° C.

Le mode opératoire décrit ci-dessus n'est certes pas à l'abri de toute critique. En effet, le contact de l'éther avec la masse semi-solide du culot de centrifugation ne s'effectue pas d'une façon complète et régulière ;

2^o La méthode qui consiste à additionner d'éther les cultures sur gélose assure évidemment un meil-

leur contact entre les corps microbiens et l'éther, mais les colonies ont encore une certaine épaisseur. Mieux vaut alors ajouter de l'éther à une émulsion de Staphylocoques, puis agiter de façon à saturer le liquide d'éther; décanter l'éther, chasser l'éther surnageant, par séjour à l'étuve, puis centrifuger, décanter le liquide surnageant, et remettre le culot en suspension dans l'eau physiologique.

Après élimination de l'éther, on ensemence une quantité connue de germes microbiens, soit 50.000.000 dans chaque boîte de PÉTRI.

La numération est effectuée après 10 jours.

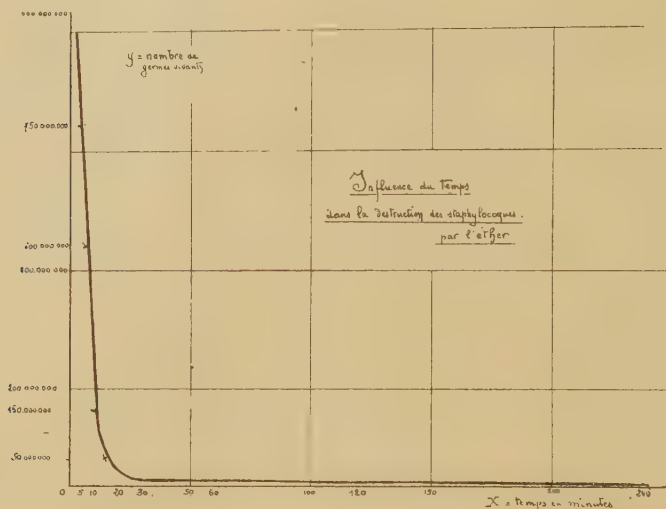
Il résulte des expériences faites, que l'éther assure, en 4 heures, la stérilisation complète d'une émulsion renfermant 500 millions de germes au centimètre cube.

Influence du temps dans la destruction

N ^{os} d'expériences	Temps d'action de l'éther en minutes	Staphylocoques vivants dans 1 cm ³ . (moyenne de 4 numérations)
1	5	545.000.000
2	10	248.800.000
3	15	53.187.000
4	20	51.150.000
5	30	10.279.430
6	60	7.272.500
7	120	123.320
8	240	0

Emulsion expérimentée : 1 milliard au 1 cm³.

La marche du phénomène peut être représentée graphiquement de la façon suivante :



Destruction des Staphylocoques par l'éther :

N ^{os} d'expériences	Races	Temps de l'action de l'éther	Numérations après 10 jours		
1	A	1/2 heure	100 germes vivants	par cm ³	
	B	»	20	»	»
2	A	1 heure	8	»	»
	B	»	30	»	»
3	A	2 heures	6	»	»
	B	»	2	»	»
4	A	4 heures	0	»	»
	B	»	0	»	»

Emulsion expérimentée : 500 millions au cm³.

Il résulte de ces expériences que la stérilisation d'une émulsion peut être réalisée en quatre heures.

TROISIÈME PARTIE

ETUDE DES POUVOIRS AGGLUTINOGENES ET SENSIBILISOGENES

Quel que soit l'intérêt de l'immunité passive, il est des cas où l'immunité active doit forcément retenir notre attention. Dans de nombreuses infections où la sérothérapie a échouée jusque là, la vaccinothérapie a permis de réaliser des guérisons inespérées, c'est ce que nous observons dans la vaccinothérapie curative. Mais, il est infiniment préférable de prévenir que de guérir, d'où l'essor considérable de la prophylaxie des maladies contagieuses. Or, parmi les armes de notre arsenal hygiénique, il en est une de toute première importance, c'est la vaccinothérapie préventive. Tout le monde connaît son rôle dans la prophylaxie de la fièvre typhoïde. Mais, il est des exemples où la sérothérapie donne de merveilleux résultats (diphthérie) et où, cependant, on désirerait développer dans l'organisme une résistance durable au lieu de la résistance passagère que détermine l'injection de sérum, d'autant plus que les accidents sériques sont quelquefois des plus impressionnants. En un mot, les résultats brillants de la sérothérapie ne

sauraient nous faire perdre de vue l'intérêt de la vaccinothérapie.

Actuellement, bien souvent, on effectue des injections de germes microbiens étrangers à l'infection, c'est revenir à la protéinothérapie par une voie détournée.

Des expériences très anciennes nous ont montré les modifications profondes que peuvent éprouver les germes soit par un passage dans un organisme déterminé, soit par culture dans un milieu déterminé. En d'autres termes, il semble qu'il y ait « spécialisation » c'est-à-dire adaptation ou plus exactement développement de types différents d'une même espèce bactérienne suivant les individus où se développent les germes microbiens et même suivant les divers organes d'un même individu. C'est cette idée qui a conduit Sir A. E. WRIGHT (1897) (1) à l'emploi des auto-vaccins. Un *Staphylocoque*, par exemple, isolé d'un individu A fournira un vaccin plus efficace pour A que le *Staphylocoque* isolé d'un individu B.

En effet, nous savons tous que les réactions anticorps ne sont pas rigoureusement spécifiques. Pour LASSEUR, une antitoxine A neutralisera beaucoup plus de toxines A que de toxines A., ou A., et infiniment plus de toxine A que de toxines B ou C. Cependant, l'antitoxine A neutralise en faible quantité, mais en quantité suffisante pour déterminer l'amélioration passagère, de la toxine C ou D.

En fait, dans ce travail, j'ai eu surtout en vue la préparation des auto-vaccins bien que je sois convaincu que les stocks vaccins et les vaccins hétérogènes puissent déterminer la modification humorale aboutissant parfois à des crises salutaires.

(1) British Medical Journal. LANCET, 10 septembre 1897.

Il paraît difficile de ramener l'immunité à une réaction purement cellulaire ou exclusivement humorale. L'immunité est la résultante des deux actions sans qu'il soit possible de préciser quelle est l'action qui prédomine dans tel ou tel processus d'immunité.

Dans tous les cas, l'immunité ou l'état de résistance s'accompagnera toujours de modifications humorales que l'on attribuera à des anticorps. Il reste bien entendu, ainsi que le fait remarquer LASSEUR, qu'on leur attribuera les propriétés nouvelles du sérum uniquement parce que l'idée de propriété est fatalement liée à celle de matière, mais on ne cherchera pas à préciser autrement la nature de ces substances inconnues.

Cependant, je m'élève contre la prétention des sérologistes qui ont limité leur champ d'action à la syphilis. Ces auteurs croient de bon ton d'épouser les idées de LE DANTREC (1919). Certes, plus que tout autre, je suis partisan de limiter les anticorps, mais, sous le vague prétexte qu'un sérum syphilitique précipite ou ne précipite pas avec telle ou telle suspension, que l'on ne vienne pas mettre en doute la réalité des antitoxines par exemple. Que les esprits forts mettent leurs actes en harmonie avec leurs paroles et s'abstiennent d'utiliser un sérum antitoxique quoi qu'il leur arrive.

Je serai ainsi conduit à étudier les sérums au point de vue agglutinant, sensibilisant et antitoxique, ou protecteur.

Auparavant, je vais dire deux mots du mode de préparation des lapins.

Les lapins, de même poids et de même âge, sont soumis aux injections de doses croissantes de vaccins chauffé, iodé, formolé et éthéré.

Les quantités de germes microbiens injectés sont les mêmes dans tous les cas, seul le mode d'atténuation diffère. Enfin, des lapins témoins sont préparés à l'aide de germes vivants.

Le nombre des injections ayant été limité à sept, le pouvoir agglutinant est infiniment moindre qu'il aurait dû être si j'avais pu prolonger mes expériences, mais, des circonstances indépendantes de ma volonté m'obligent à limiter mon séjour en France.

Au cours des expériences, les températures des animaux ont été prises, deux fois par jour. Il résulte de mes observations que les élévations de température les plus importantes ont été observées avec le Staphylocoque vivant. La première injection a été effectuée avec 50.000 germes et la dernière (9^e) avec 1.000.000 de germes.

Dès la 6^e injection (600.000 germes), la réaction thermique a été très faible, et nulle à la 7^e, 8^e et 9^e, ce qui démontre, une fois de plus, qu'il est infiniment plus facile d'arriver à l'immunité à l'aide de germes vivants qu'avec l'aide de germes morts.

Le vaccin éthéré n'a pas donné d'élévation thermique supérieure à 0°6 ou 0°8. A cette épreuve, le vaccin éthéré s'est révélé comme étant le plus atoxique de tous ceux que j'ai utilisés.

Le vaccin iodé n° 1, jusqu'à la 7^e injection, a donné des réactions thermiques assez élevées.

Le vaccin iodé n° 2, jusqu'à la 5^e injection, a donné des réactions thermiques, mais beaucoup plus faibles qu'avec le vaccin n° 1. C'est le vaccin qui se rapproche le plus du vaccin éthéré.

Le vaccin formolé se comporte sensiblement comme le vaccin chauffé.

12 jours après la dernière injection, le sang a été prélevé par ponction de la carotide suivant la technique utilisée au laboratoire de Microbiologie.

Agglutination

La mesure du pouvoir agglutinant a été déterminée par la méthode macroscopique utilisée au laboratoire de Microbiologie. Elle consiste à utiliser des émulsions de richesse microbienne constante. 1 cm³ d'émulsion est additionné de 1 cm³ de sérum dilué successivement au 1/40, 1/50, 1/60, 1/80..... 1/300. Temps de contact : 6 heures, à 37° C.

Les cocci fournissent en général un sérum beaucoup moins agglutinant que les bacilles. Ainsi, on obtient aisément des sérums agglutinant les bacilles, au 1/50.000 et 1/100.000, les nombres sont infiniment moindres et avec les cocci, avec le Staphylocoque en particulier, les taux d'agglutination sont relativement faibles. Il est vrai que KOLL et OTTO (1902) ont observé un sérum agglutinant le Staphylocoque au 1/1200, mais ces taux sont rares.

NICOLAS et LESIEUR (1901) expérimentant avec des Staphylocoques de souches différentes, isolées d'ostéomyélites et d'abcès, après inoculation à la chèvre n'ont pu obtenir un sérum agglutinant qu'avec les types provenant de l'ostéomyélite.

De même dans une ostéomyélite, AMBERGER obtient une agglutination qui varie de 1/20 à 1/400, suivant la souche de Staphylocoque utilisée.

Dans les infections humaines, très souvent l'agglutina-

tion a lieu dans les cas d'infections graves. L'agglutination est nulle dans les cas d'infections légères ou locales.

Lapin préparé avec des Staphylocoques vivants

Le sérum agglutine :

Staphylocoque vivant au :	1/200; 1/200;
— chauffé au :	1/125; 1/200
— iodé n° 1 au :	1/150; 1/200; 1/200
— iodé n° 2 au :	1/125; 1/200; 1/150
— formolé au :	1/125; 1/150; 1/200
— éthéré au :	1/300; 1/250; 1/250

M. NICOLLE (1908), depuis bien longtemps, a montré combien il est facile d'arriver à l'hypersensibilité avec les microbes morts et combien, au contraire, il est difficile de parvenir à l'immunité par l'emploi de ces mêmes germes.

L'emploi de germes vivants qui a conduit assez rapidement à l'état réfractaire donne un sérum qui agglutine sensiblement tous les germes au même titre. Nous ferons une exception pour le Staphylocoque traité par l'éther; certes, les chiffres obtenus sont voisins de ceux fournis par les autres germes microbiens, mais, comme avec tous les sérums, le vaccin à l'éther est agglutiné à un taux toujours plus élevé, il y a donc lieu de bien noter ce fait ⁽¹⁾.

Lapin préparé avec Staphylocoques chauffés

Le sérum agglutine :

Staphylocoque chauffé au :	1/150; 1/150
— vivant au :	1/150; 1/150
— iodé n° 1 au :	1/200; 1/250
— iodé n° 2 au :	1/150; 1/150
— formolé au :	1/125; 1/150
— éthéré au :	1/200; 1/250; 1/200

(1) Des recherches ultérieures ont montré que le staphylocoque traité par l'éther précipite beaucoup plus facilement par les ions +++ que les staphylocoques vivants.

Le sérum de lapin préparé avec des Staphylocoques chauffés ne présente aucune caractéristique, si ce n'est le taux maximum d'agglutination observé par le vaccin éthéré.

Les sérums iodés n° 1 et 2 ont été obtenus en injectant respectivement les vaccins n° 1 et 2. Nous rappelons que dans le vaccin n° 1, l'excès d'iode a été neutralisé par l'hyposulfite. Dans le vaccin n° 2, on s'est borné à centrifuger, décanter et éliminer l'iode en excès.

Lapin préparé avec des Staphylocoques iodés n° 1

Le sérum agglutine :

Staphylocoque iodé n° 1 au :	1/200;	1/250;	1/250;	1/250
— iodé n° 2 au :	1/200;	1/150;	1/125	
— vivant au :	1/200;	1/300;	1/150;	1/200
— chauffé au :	1/200;	1/200;	1/150;	1/200
— formolé au :	1/200;	1/150;	1/150;	1/200
— éthéré au :	1/300;	1/250;	1/300;	1/250

Lapin préparé avec des Staphylocoques iodés n° 2

Le sérum agglutine :

Staphylocoque iodé n° 2 au :	1/250;	1/300
— iodé n° 1 au :	1/250;	1/250
— vivant au :	1/200;	1/250
— chauffé au :	1/150;	1/200
— formolé au :	1/150;	1/150
— éthéré au :	1/250;	1/300

Les sérums iodés obtenus avec les vaccins iodés se comportent sensiblement comme les sérums obtenus avec les vaccins éthérés et formolés. Ce fait n'était pas vraisemblable a priori. En effet, dans des expériences nombreuses

et déjà anciennes, OBERMAYER et PICK (1902-1906) ont montré que les albumines soumises à l'action de l'iode ou à la diazoréaction fournissent des anticorps réagissant surtout avec les albumines ainsi modifiées et que les anticorps sont pratiquement sans effet sur les albumines originelles. De même FREUND (1909) a montré que des albumines d'origines diverses, mais iodées, donnent naissance à des anticorps réagissant avec les albumines iodées, quelle que soit l'origine de l'albumine. Ces conclusions ne sont valables que pour la précipitation.

Dans la production du choc anaphylactique, on retrouve la spécificité générique des albuminoïdes soient iodés ou la spécificité générique des albuminoïdes, qu'ils soient iodés ou non, WEILL (1911), WEILL et SPÄT (1911), PICK et JAMANOUCI (1908-1909). Cela s'explique aisément. Pour LASSEUR, dans tous les cas, il y a eu réaction, mais son intensité varié dans de grandes proportions. Or, pour rendre cette réaction objective, il faudra mettre en œuvre des quantités de substances infiniment plus grandes dans le cas de la précipitation que dans celui du choc anaphylactique. Il s'en suit que la première réaction peut passer inaperçue dans les conditions habituelles où l'on opère, mais qu'il serait certainement possible de la rendre objective par l'examen ultra-microscopique.

Si la dose d'iode utilisée est infiniment plus grande, on arrive à déterminer des modifications profondes de la substance protéique. Les animaux préparés avec l'albumine normale ne réagissent plus à l'injection de cette albumine additionnée d'iode aux fortes concentrations.

Le problème est donc beaucoup plus complexe que certains peuvent le prétendre, aussi était-il instructif de

constater comment se comportaient les plastides bactériens iodés en temps que générateurs d'anticorps.

Ce que nous savions des albumines iodées pouvait nous faire penser à des modifications chimiques des albumines corporelles du plastide bactérien. Nous avons vu en quoi cette hypothèse était fondée.

Je vais maintenant étudier les vaccins formolés. Au dire de certains savants, le formol produirait un véritable « embaumement » des corps microbiens. Mais il ne faut pas oublier que l'« embaumement » détermine des modifications de la cellule. Ainsi DUNGERN et COCA (1907) en fixant les globules par l'acide osmique obtenaient des globules qui résistaient à l'action de l'eau distillée. Par l'inoculation de ces globules, on obtenait une hémolyse spéciale surtout active vis-à-vis de ces globules.

La seule fixation par l'acide osmique avait donc modifié la cellule d'une façon très importante.

D'un autre côté, nous savons que dans la fixation du formol par la levure, la fixation est indépendante de la concentration, par suite, il semble que l'on ait affaire à une réaction chimique. A ces titres différents, il était intéressant d'étudier les propriétés du sérum de lapin obtenu avec des animaux préparés avec des Staphylocoques formolés.

Lapin préparé avec des Staphylocoques formolés

Le sérum agglutine :

Staphylocoque	formolé au :	1/150;	1/125
—	iodé n° 1 au :	1/250;	1/200
—	iodé n° 2 au :	1/200;	1/200
—	vivant au :	1/200;	1/200
—	chauffé au :	1/125;	1/150
—	éthéré au :	1/200;	1/250

Lapin préparé avec des Staphylocoques éthérés

Le sérum agglutine :

Staphylocoque éthéré au :	1/300; 1/250; 1/200
— formolé au :	1/150; 1/200; 1/150
— iodé n° 1 au :	1/200; 1/250; 1/200
— iodé n° 2 au :	1/200; 1/150; 1/125
— chauffé au :	1/300; 1/300; 1/250
— vivant au :	1/250; 1/300

Le vaccin éthéré est plus agglutinable que le vaccin traité par les autres agents chimiques. Le fait n'était pas non plus vraisemblable à priori. En effet, nous pouvons admettre qu'il reste un peu d'éther dans la suspension, et, de ce fait, nous abaissons la tension superficielle du mélange. Ainsi la tension superficielle de l'eau est de 72,53 dyn. cm., tandis que celle de l'éther est de 16,5 dyn. cm. Par suite nous augmentons la stabilité de la suspension. Or, c'est juste l'inverse que montre l'expérience. La suspension est moins stable que les suspensions qui n'ont pas été soumises à l'action de l'éther. Il est possible que l'on trouve l'explication du phénomène dans le fait suivant : les échantillons d'éther, non fraîchement purifié, renferment toujours un peu H^2SO^4 ; par évaporation, l'éther et l'alcool disparaissent mais H^2SO^4 demeure et, de ce fait, la tendance à la précipitation de la suspension microbienne est augmentée. Il n'y a là qu'une hypothèse, mais très vraisemblable cependant.

On est frappé cependant du peu de différence présentée par l'agglutinabilité des différents vaccins, cela tient certainement, d'une part, à ce que le taux d'agglutination n'étant pas très élevé, il ne peut pas y avoir de différences fort gran-

des, et que, d'autre part, les coccis du groupe des Staphylocoques sont, en général, infiniment plus résistants aux agents extérieurs que les bactéries en batonnet ou en spirale. En effet, nous savons que, vis-à-vis de l'iode par exemple, certains Staphylocoques se comportent presque comme les spores.

En résumé, l'agglutination classe sur le même rang, les vaccins étherés et iodés. Les plastides bactériens formolés ne nous ont pas donné les excellents résultats indiqués par COSTA. Le pouvoir agglutinogène des plastides formolés est plus faible que celui des plastides iodés ou étherés, ou vivants, il est de l'ordre de celui des plastides chauffés.

Remarque

On sait que le chauffage d'une culture à 65°, 70° ou 80° provoque très fréquemment l'inagglutinabilité de cette culture. Le fait est incontestable avec de nombreuses bactéries, mais est-il d'ordre général ? Le Staphylocoque étant assez peu sensible à l'action de nombreux agents actifs sur les Bacilles, il y avait lieu d'essayer l'action de la température sur l'agglutination des émulsions de Staphylocoques.

A cet effet, des émulsions de Staphylocoques ont été chauffées à 60, 63, 70, 80 et 100° durant 30 minutes. Les résultats obtenus sont indiqués ci-dessous :

Emulsion chauffée à	Taux de l'agglutination :
60°	1/300
63°	1/300
70°	1/250
80°	1/200
100°	1/150
témoin	1/300

Evidemment, il y a une légère diminution du taux de l'agglutination, mais cette faible diminution est insignifiante, si on la compare à celle réalisée avec *B. Balticus* par exemple. Ce bacille non chauffé est agglutiné au 1/20.000, après chauffage à 80°, le même sérum n'agglutine plus le bacille même au 1/100 (LASSEUR).

En résumé, nous retrouvons là encore une différence dans la façon dont se comporte les Staphylocoques et les Bacilles vis-à-vis des agents physiques.

Recherche des sensibilisatrices

L'agglutination est certainement une réaction d'infection, mais il n'est nullement démontré qu'elle soit une manifestation de l'immunité. Cependant j'ai attaché une importance pratique à la détermination du pouvoir agglutinant et cela pour les motifs suivants : Nous savons que les antigènes à grosses molécules sont presque toujours polyvalents au sens de PICK (1912), c'est-à-dire qu'il ne se bornent pas à faire apparaître un pouvoir déterminé dans les humeurs de l'organisme, le pouvoir antitoxique par exemple, mais que parallèlement à ce pouvoir antitoxique, on voit apparaître le pouvoir sensibilisant ou agglutinant. Il n'y a guère d'exception que pour les antigènes à petite molécule : toxines diphtériques et tétaniques. Ces toxines paraissent, en effet, agir surtout, mais non exclusivement, comme des antigènes monovalents. Ainsi, les sérums antitoxiques obtenus à l'aide de toxines diphtériques sont très pauvres en sensibilisatrice mais, cependant, ils renferment une assez grande quantité d'anticorps pour permettre la

fixation d'une ou deux unités d'aléxine (NICOLLE, POZERSKI et ABT, (1908), A. DELILLE (1911).

NICOLLE (1908), LASSEUR et SPILLMANN (1921) sont tentés d'identifier l'agglutinine avec la sensibilisatrice. Il n'y aurait là, somme toute, qu'une même propriété du sérum rendue objective à des échelles différentes. Cette hypothèse est très séduisante, mais elle n'est pas toujours d'accord avec les faits. Quoi qu'il en soit, je n'accepte pas les vues d'esprits plus acerbes que critiques qui, suivant les intérêts du moment nient ou admettent l'existence des anticorps. Parmi ces auteurs, certains, à défaut d'argument entraînant la conviction, nous offrent des mots sonores qui n'ont ni l'intérêt de la précision, ni même l'excuse de la nouveauté.

En définitive, ceux qui ne limitent pas la sérologie au seul compartiment de la syphilis, considèrent les sensibilisatrices comme des anticorps dont l'étude a rendu les plus grands services, tant dans le domaine de la Microbiologie pure (diagnostic de l'antigène, parenté biologique), que dans celui de la clinique (diagnostic de l'infection).

A mon avis, la destruction de l'antigène, la cytolysé de l'élément bactérien mettra en œuvre deux facteurs : l'élément cellulaire et l'élément humoral. S'il est impossible d'assigner une prédominance à l'un ou à l'autre de ces facteurs, nous savons fort bien que les réactions humorales jouent un rôle capital dans l'immunité. Ainsi sommes nous conduit à rechercher le pouvoir sensibilisant des sérums.

J'ai préparé, suivant la technique du Laboratoire de Microbiologie, tout le matériel nécessaire à mes recherches. J'indiquerai, tout d'abord, brièvement, la marche des opérations effectuées.

Hemolyse

Dans l'hémolyse, j'étudie :

- 1° La préparation des lapins;
- 2° Le titrage des sérums.

1° *Préparation des lapins.* — Le sang de mouton débriné a été lavé 6 fois, puis ramené au volume primitif. Les hématies ont été injectées à 6 lapins mâles adultes. On opère par voie intrapéritonéale et à doses croissantes. La dose maximum varie de 10 à 20 cm³ par animal, suivant la résistance des individus mis en expériences. Le nombre des injections a été de 6 ou 7. Il est incontestable qu'une seule injection massive donne des sérums infiniment moins actifs que les injections croissantes et répétées. Mon assertion est basée non seulement sur mes propres observations, mais encore sur la statistique de l'ensemble des lapins préparés au Laboratoire de Microbiologie, soit plus de 100 animaux.

Les animaux ont été saignés 8 à 10 ou 12 jours après la dernière injection, suivant la quantité de globules injectés pour la dernière fois. Le sérum a été réparti en ampoules et chauffé à 56°. Puis, ensuite, il a été procédé au titrage du sérum hémolytique.

2° *Titrage des sérums.* — LASSEUR et SPILLMANN (1921) ont montré qu'à chaque type de sérum correspond des émulsions d'hématies de titres déterminés. Certains sérums permettent l'emploi d'émulsions à 5%, 4%, 3% ou 2%, d'autres, au contraire, ne permettent pas l'emploi d'émulsion de titre supérieur, soit à 4%, soit à 3%.

Ainsi, considérons le cas d'un sérum ne pouvant pas être utilisé avec des émulsions de titre supérieur à 3%, on serait tenté de croire qu'il serait possible d'employer des émulsions à 4 ou 5%, en employant des doses triples ou doubles de sérum hémolytique, or le fait est absolument inexact.

Lorsque l'on a déterminé l'ordre de grandeur de l'émulsion, on procède au titrage du sérum hémolytique en fonction de l'unité de globule adoptée : 1 cm³ à 5%, ou 1 cm³ à 4%, ou 1 cm³ à 3%, etc...

Dans une série de tubes pouvant contenir 40 cm³, on ajoute de l'eau physiologique, puis les globules, et ensuite des doses croissantes de sensibilisatrice hémolytique. Le tout est amené au volume de 40 cm³. Lorsque l'on connaît l'ordre de grandeur du pouvoir sensibilisant du sérum, on peut se contenter d'effectuer des mélanges de 20 cm³ de globules rouges sensibilisés à des doses croissantes; c'est ce que j'indique dans le tableau suivant où sont consignés les résultats obtenus avec le sérum hémolytique.

Désignation
des
systèmes

Composition des systèmes

4 N	Eau physiol.	12 cm	+	sensib. hémol.	à 10%	8 cm ³	+	G.R.O.6
3 N	»	14 cm ³	+	»	10 %	6 cm ³	+	G.R.O.6
2,5N	»	15 cm ³	+	»	10 %	5 cm ³	+	G.R.O.6
2 N	»	16 cm ³	+	»	10 %	4 cm ³	+	G.R.O.6
1,5N	»	17 cm ³	+	»	10 %	3 cm ³	+	G.R.O.6
N	»	18 cm ³	+	»	10 %	2 cm ³	+	G.R.O.6
3/4N	»	18,50	+	»	10 %	1,50	+	G.R.O.6
N/2	»	19 cm ³	+	»	10 %	1 cm ³	+	G.R.O.6
N/4	»	19,50	+	»	10 %	0,5	+	G.R.O.6
N/8	»	19,75	+	»	10 %	0,25	+	G.R.O.6

Les dosages sont effectués sous un volume constant de 3 cm³. Les hématies sont sensibilisées durant 30 minutes avant d'être mises en contact avec l'alexine.

L'alexine utilisée est âgée de 16 à 18 heures. Ces solutions sont évidemment moins actives que l'alexine fraîche, mais elles ont l'avantage capital de ne pas offrir un fléchissement notable durant les opérations.

Toutes les expériences ont été effectuées en double. On détermine rapidement d'abord quelques points de la courbe, puis on précise ces points et les points intermédiaires. Le titrage d'un sérum hémolytique devient ainsi une opération longue mais, si on veut bien se rappeler qu'un lapin préparé avec soin peut servir à effectuer des centaines (500 à 1.500) de réactions, on conviendra qu'il n'est pas fastidieux de passer 2 ou 3 séances à titrer rigoureusement un sérum, si ce dernier suffit à la consommation qui en est faite pendant 6 mois à un an.

On utilise des dilutions variables d'alexine, depuis les solutions à 1,25% jusqu'aux solutions à 10%.

J'indique ci-après les résultats obtenus avec quelques concentrations de sensibilisatrice. Les mesures ont été déterminées d'après le protocole figuré au tableau suivant.

Alexine 2,50 %	Eau physiologique	G. R. S.	Hémolyse
0,35 cm ³	1,65 cm ³	1 cm ³	0
0,4	1,6	1	0
0,45	1,55	1	0
0,5	1,5	1	0
0,55	1,45	1	totale
0,6	1,4	1	totale
0,7	1,5	1	totale

Alexine 1,25 %	Hémolyse				
	4 N	3N	2,5 N	2 N	1,5 N
0,2 cm ³	0	0			
0,25	0	0	0		
0,3	totale	totale	0		
0,35	T	T	Totale	0	
0,4	T	T	T	0	
0,45	T	T	T	Totale	
0,5				T	0
0,55				T	0
0,65					Totale
0,7					T

Alexine 2,5 %	Hémolyse		
	N	3 N 4	N/2,5
0,3 cm ³	0		
0,35	0		
0,4	0		
0,45	Totale	0	
0,5	T	0	
0,55	T	Totale	
0,6		T	0
0,65		T	0
0,7			Totale
0,8			T
0,9			T

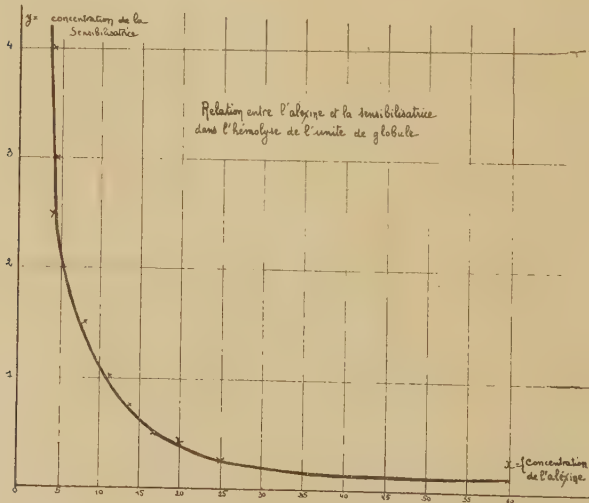
Alexine 5 %	N/4	Alexine 10 %	N/8
0,4 cm ³	0	0,4	0
0,5	Totale	0,5	0
0,6	T	0,6	Totale
0,7	T	0,7	T
0,8		0,8	T

Remarque : Du fait de l'agglutination des hématies, les lectures manquent de précision en 3 N et 4 N.

En résumé, nous obtenons les nombres suivants :

Concentration de la sensibilisatrice :	Concentration de l'alexine :
4 N	3,75
3 N	3,75
2,5 N	4,37
2 N	5,6
1,5 N	8,12
N	11,25
3 N 4	13,75
N/2	17
N/2,5	20
N/4	25
N/8	60

Les nombres obtenus permettent d'établir la courbe suivante :



L'examen de la courbe montre que le sérum examiné est d'assez faible activité; cependant pour une émulsion à 2,5 au lieu de celle à 3% qui a été utilisée dans ce titrage, l'activité du sérum est suffisante pour permettre l'emploi d'alexine à 7,5%. En d'autres termes, pour hémolyser 1 cm³ de globules rouges de mouton (à 2,5%), sous un volume de 3 cm³, il faut utiliser 0,1 cm³ de sérum de cobaye (alexine) à 7,5%, le sérum est âgé de 16 à 18 heures. L'hémolyse est effectuée en 30 minutes, à la température de 37°.

Technique de la fixation de l'Alexine

L'antigène (émulsion de Staphylocoques vivants, chauffés, iodés, formolés, etc...) et l'anticorps (sérum de lapin préparé) sont employés à des doses telles qu'ils n'influencent pas d'une façon sensible la marche de l'hémolyse. A cet effet, le sérum de lapin vacciné a été amené à une concentration convenable. Comme le pouvoir sensibilisant n'était pas très élevé, je me suis borné à la dilution de 1/5.

Le temps de contact de l'anticorps et de l'antigène a été de 3 heures, une heure et demie, à la température du laboratoire, et une heure et demie, à celle de 37°.

Nous désignerons sous le nom de sérum St. vivants, sérum St. chauffé, Sérum St. Iodé n° 1, etc... les sérums provenant de lapins immunisés respectivement avec des Staphylocoques vivants, chauffés, iodés, etc...

Les quantités d'alexine fixées sont exprimées en unités hémolytiques. Je rappelle que je désigne sous le nom d'unité hémolytique, la quantité d'alexine capable d'hémolyser l'unité de globule dans l'unité de temps, et cela en présence

de la quantité de sensibilisatrice déterminée par l'étude de la courbe du sérum sensibilisant.

Exemple : Supposons que dans un cas, il faille : 0 cm³ 1 d'une solutions d'alexine (sérum de cobaye) à 10% pour déterminer l'hémolyse de l'unité de globule, 0 cm³ 1 de la solution à 10% constituera l'unité d'alexine. De même, 0 cm³ 1 de la solution à 7,5% constituera l'unité si un autre sérum de cobaye de la solution à 7,5% doit être utilisé seulement à la dose de 0 cm³ 1.

Dans la recherche du pouvoir sensibilisant du sérum, certains auteurs utilisent 0 cm³ 1 de sérum, d'autres 0 cm³ 2, d'autres 0 cm³ 3; aussi je crois devoir ramener mes chiffres au centimètre cube.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

Désignation du sérum	Désignation de l'antigène	Quantité d'alexine fixée par cm ³ de sérum
Sérum à Staph. vivants.	St. vivants	5
	St. chauffés	5
	St. iodés n° 1	15
	St. iodés n° 2	10
	St. étherés	15
	St. formolés	10
Sérum à Staph. chauffés	St. vivants	5
	St. chauffés	5
	St. iodés n° 1	5
	St. iodés n° 2	5
	St. étherés	10
	St. formolés	10

Désignation du sérum	Désignation de l'antigène	Quantité d'alexine fixée par cm ³ de sérum
Sérum à Staph. iodés n° 1	St. vivants	10
	St. chauffés	10
	St. iodés n° 1	15
	St. iodés n° 2	15
	St. étherés	15
	St. formolés	10
Sérum Staphyl. iodés n° 2	St. vivants	5
	St. chauffés	5
	St. iodés n° 1	10
	St. iodés n° 2	15
	St. étherés	15
	St. formolés	10
Sérum Staphyl. étherés.	St. vivants	15
	St. chauffés	10
	St. iodés n° 1	15
	St. iodés n° 2	20
	St. étherés	15
	St. formolés	10
Sérum Staphyl. formolés.	St. vivants	15
	St. chauffés	10
	St. iodés n° 1	15
	St. iodés n° 2	10
	St. étherés	15
	St. formolés	10

L'examen de ce tableau montre que les antigènes doivent être étudiés au double point de vue de leur pouvoir sensibilisogène et fixateur.

Au point de vue sensibilisogène, les vaccins se classent dans l'ordre décroissant suivant :

V. étheré, V. formolé et V. iodé n° 1, V. chauffé et V. iodé n° 2.

Le vaccin étheré est manifestement supérieur aux autres antigènes; quant aux vaccins formolés et iodés, ils sont

doués, l'un et l'autre, d'un pouvoir sensibilisogène du même ordre de grandeur. Par contre, les vaccins chauffés et iodés n° 2 ont un pouvoir sensibilisogène nettement inférieur à celui des deux vaccins précédents.

Quant au pouvoir fixateur, il est plus difficile à apprécier. Cependant le vaccin éthéré offre le pouvoir fixateur le plus élevé, ensuite viennent les vaccins iodés, puis, successivement, les vaccins formolés, vivants et chauffés.

Il est à remarquer que le vaccin formolé se comporte de la même façon quel que soit le sérum utilisé. Ce fait ne plaide pas en faveur de la thèse des auteurs qui voient dans le formol un fixateur admirable produisant un véritable « embaumement ».

ANNEXE

Action du temps sur les vaccins

Les vaccins, comme les toxines et les antitoxines, subissent des modifications considérables avec le temps. Il ne saurait en être autrement, puisque, en définitive, les plastides bactériens sont essentiellement formés de colloïdes. Il m'a donc paru utile de rechercher la façon dont se comportent les vaccins chauffés, iodés, formolés, etc... placés les uns à la cave (température constante), les autres au laboratoire, ou à l'étuve à 37°. Après une attente de 5 mois, j'ai procédé à l'examen macroscopique et microscopique de ces vaccins, et ce sont les résultats de mes observations que je vais maintenant résumer.

Examen macroscopique

Vaccins conservés à la cave. — Après 5 mois de séjour à la cave, les vaccins iodés, formolés, chauffés donnent un dépôt qui, par agitation, fournit une suspension homogène. Par contre, le vaccin éthéré donne un dépôt floconneux ne se laissant pas homogénéiser par agitation.

Vaccins conservés au laboratoire. — Les vaccins conservés au laboratoire se comportent sensiblement comme les

vaccins maintenus à la température de la cave. Les vaccins éthérés seuls ne redonnent pas une émulsion homogène.

Vaccins conservés à l'étuve à 37°. — Les vaccins chauffés et éthérés donnent un dépôt floconneux qui, par agitation, ne produit pas d'émulsion homogène. Par contre, les vaccins formolés et iodés fournissent des émulsions homogènes par simple agitation.

Examen microscopique

Les plastides bactériens iodés ou formolés, maintenus durant 5 mois à la température de la cave, du laboratoire, de l'étuve à 37° C, conservent leur forme, leur structure, leur réfringence et leur colorabilité. Rien ne permet de les distinguer des plastides vivants.

Par contre, les vaccins chauffés montrent des plastides déformés ne se laissant pas colorer uniformément par les colorants basiques.

Avec les vaccins éthérés, les phénomènes lytiques sont encore plus accusés, on ne retrouve que des débris cellulaires et quelques rares plastides toujours plus ou moins déformés.

Préparation des vaccins

La préparation de l'émulsion et la détermination de la richesse bactérienne ayant été indiquée antérieurement, je me bornerai à préciser les modes d'atténuation. Nous examinerons donc successivement la préparation du vaccin chauffé, iodé, formolé et éthéré.

Vaccins chauffés. — L'émulsion amenée au titre de n milliards est répartie aseptiquement en ampoules. Les ampoules sont ensuite chauffées à la température de 66°-68° C, pendant 30 minutes. Durant le chauffage, le thermostat doit être maintenu à une température constante. On utilisera pour cela des appareils calorifugés à régulateur suffisamment sensible, et munis d'agitateur mécanique réalisant un brassage suffisant de la masse liquide.

Le contrôle de la stérilité s'effectue en ensemençant le contenu d'une ampoule dans 20 ou 30 cm³ de bouillon. Attendre au moins 4 jours avant de conclure à la stérilité.

Vaccins iodés. — Dans la préparation des vaccins iodés, on utilise deux liqueurs :

1° La solution de Lugol :

Iode ;.....	1 gr.
L K	2
Eau Q. S.	200 cm

2° Une solution stérile d'hyposulfite de soude à 2 %.

L'émulsion lavée (1 fois) et titrée est traitée par la solution d'iode dans la proportion de 9 cm³ d'émulsion pour 1 cm³ de Lugol. On laisse en contact durant 15 minutes. Puis, on neutralise l'excès d'iode à l'aide de la solution d'hyposulfite de soude employée goutte à goutte jusqu'à disparition de la teinte jaune de l'émulsion. On centrifuge, on décante, on remet les germes microbiens en suspension, et on homogénéise si cela est nécessaire. Enfin, on ramène l'émulsion au titre de un milliard, et on la répartit en ampoules.

Toutes ces opérations, comme dans la préparation de tous les vaccins, doivent être effectuées aseptiquement.

Pour tous les vaccins préparés à l'aide d'agents chimiques, le contrôle de la stérilité s'effectue en ensemençant un cm^3 de vaccin dans au moins 20 cm^3 de bouillon, et en faisant ensuite un second passage en bouillon. Il ne faut pas oublier que certains germes ne se multiplient qu'après 2 ou 3, même 4 jours. Il y a là un retard dans la croissance dont il faut tenir compte. Dans une vaccination bien conduite, c'est-à-dire à injections suffisamment espacées qui ne seraient pas faites en phase négative, la présence de quelques germes encore vivants, mais aussi gravement atteints dans leur métabolisme n'aurait aucune importance, par contre, dans une vaccination trop précipitée ou faite en phase négative, ou chez un individu très déprimé, des germes même aussi gravement atteints dans leur vitalité pourraient donner lieu à des accidents des plus regrettables. Cette remarque relative aux germes vivants mais à vitalité ralentie est d'ordre général, et elle s'applique à tous les vaccins.

Vaccins formolés. — La première opération à effectuer quand on prépare des vaccins formolés, c'est la vérification du titre de la solution de formol commercial. Après avoir rectifié, s'il y a lieu, le titre de cette solution commerciale, on ajoute le formol à l'émulsion, dans la proportion de 1 cm^3 de formol pour 9 cm^3 d'émulsion. On laisse en contact 20 minutes, puis on centrifuge, on décante, et on lave à l'eau physiologique, on homogénéise l'émulsion s'il y a lieu. On ramène l'émulsion au titre voulu, et on la distribue en ampoules.

Toutes les opérations doivent être effectuées aseptiquement. Le contrôle de la stérilité s'effectue comme dans la préparation des autres vaccins.

Vaccins éthérés. — L'émulsion lavée est mise dans un flacon stérile bouché à l'émeri. On recouvre l'émulsion de quelques millimètres d'éther, puis on agite afin de saturer l'eau d'éther. La destruction des germes serait beaucoup plus rapide, si on soumettait l'émulsion à une agitation continue. Après agitation, on décante l'éther, puis on chasse les dernières traces par un séjour à l'étuve et en faisant le vide, on centrifuge, on décante le liquide surnageant, on remet en suspension dans l'eau physiologique. On ramène au titre voulu et on répartit en ampoules. Le contrôle de la stérilité s'effectue comme il a été indiqué antérieurement pour les autres vaccins.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° Le Staphylocoque se développe extrêmement bien sur gélose-bouillon, salée à trois pour cent.

2° La numération donne d'excellents résultats, à la condition d'opérer sur des émulsions homogènes et d'employer des appareils adaptés à ces recherches.

Le compte microbe de JOUAN donne de meilleurs résultats que ceux fournis par la Chambre de THOMA-ZEISS.

Les tentatives de stabilisation des émulsions à l'aide de gélatine, gomme arabique, albumine, etc... n'ont pas amélioré notablement la précision des mesures.

Les techniques néphélométriques ne donnent de bons résultats que dans des conditions bien déterminées. Les émulsions doivent être soigneusement lavées et les bactéries à comparer doivent être de même taille.

3° L'emploi du bleu de méthylène et du bleu de toluidine très dilué permet de constater chez le Staphylocoque, l'existence d'un grain chromatique : c'est par la méthode fuchsin-formol-encre de CHINE de LASSEUR, que l'on perçoit le mieux les détails de structure.

4° Le chauffage à 56°, durant 2 heures, ne modifie ni la réfringence, ni la colorabilité du plastide. Mais l'action de la chaleur (56°), durant 3 heures, diminue déjà la colorabilité par la méthode de GRAM.

5° Un chauffage de 30 minutes, à 72° C, ne détermine pas de modifications morphologiques aussi sensibles qu'un chauffage à 56°, durant 9 heures.

6° L'éther ne modifie pas d'une façon tangible l'aspect microscopique du plastide bactérien. Le formol se comporte de la même façon. Avec l'iode, la colorabilité est diminuée pour le bleu de méthylène, mais augmentée pour la fuchsine.

7° Le chauffage à 60°, 62°, 64°, durant 30 ou 45 minutes, est insuffisant pour détruire la totalité des germes microbiens.

Les souches A et B offrent des résistances voisines, mais cependant nettement différentes.

8° Dans la destruction des germes par l'iode, la quantité de germes détruits est fonction de la concentration, mais il n'y a pas de proportionnalité directe.

9° La quantité d'iode fixée par les plastides bactériens croît avec la concentration, mais il n'y a pas de proportionnalité directe. Il existe un maximum au-delà duquel la quantité d'iode fixée diminue.

10° La fixation de l'iode par les plastides bactériens se rattache aux phénomènes d'adsorption.

11° L'action du formol est fonction de la concentration en formaldéhyde, de la durée de l'action du formol et de la teneur de la suspension en germes microbiens.

12° Dans la préparation des lapins avec les différents vaccins, les élévations de température les plus importantes ont été observées avec le Staphylocoque vivant.

13° Le vaccin éthéré n'a pas donné d'élévation thermique supérieure à 0,6, 0,8 C.

14° Le vaccin iodé n° 1 a donné des réactions thermiques assez élevées, plus élevées que celles produites par le vaccin iodé n° 2.

15° Le vaccin formolé se comporte sensiblement comme le vaccin chauffé.

16° Au double point de vue du pouvoir agglutinogène et de l'agglutinabilité, l'agglutination classe sur le même rang les vaccins éthérés et iodés.

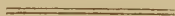
Le pouvoir agglutinogène des plastides formolés est plus faible que celui des plastides iodés ou éthérés ou vivants, il est de l'ordre de celui des plastides chauffés.

17° L'étude des sérums hémolytiques ne peut être effectuée d'une façon précise qu'à la condition d'établir les courbes décrites par LASSEUR et SPILLMANN.

18° Au point de vue du pouvoir sensibilisogène, les vaccins se classent dans l'ordre décroissant suivant : Vaccin éthéré, Vaccin formolé, Vaccin iodé n° 1, Vaccin chauffé, Vaccin iodé n° 2. Le vaccin éthéré est manifestement supérieur aux autres antigènes; quant aux vaccins formolés et iodés ils sont doués d'un pouvoir sensibilisogène du même ordre de grandeur.

Le vaccin éthéré offre le pouvoir fixateur le plus élevé.

19° Les vaccins éthérés se conservent très mal. Ils résistent peu à l'action du temps, qu'ils soient conservés à la cave, au laboratoire ou à l'étude. L'éther ne doit donc être utilisé que dans la préparation des autovaccins.



LISTE DES AUTEURS CITÉS

1878. PASTEUR. — Le microbe du furoncle et de l'ostéomyélite trouvé dans l'eau. *C. R. Ac. des Sc.*, t. 79, p. 1033.
1881. OGSTON. — Report upon Mikroorganismen in surgical disease. *The British méd. Jour.*, 12 mars.
1887. WASSERZUG. — Sur la formation de la matière colorante chez le *B. pyocyannique*. *Ann. Inst. Past.*, t. 1, p. 581.
1888. WASSERZUG. — Variations durables de la forme et de la fonction chez les Bactéries. *Ann. Inst. Past.*, t. 2, p. 154.
1895. CRAMER. — Die Zusammensetzung der Cholera bacillen. *Archiv. f. Hyg.*, t. 22, p. 167-190.
1897. CRAMER. — Die Aschebestandtheile der Cholera bacillen. *Archiv. f. Hyg.*, t. 28, p. 1-15.
1899. STADLER. — Ueber die Einwirkung von Kochsalz auf Bakterien, die bei den sogenannten Fleischvergiftungen eine Rolle spielen. *Archiv. f. Hyg.*, t. 35, p. 40-82.
1901. NICOLAS et LESIEUR. — Sur l'agglutination de *Staphylococcus aur.* par le sér. des animaux vaccinés et infectés. *C. R. Soc. Biol.*, t. 26, p. 1.
1902. KOLLE und OTTO. — Die Differenzierung der Staphylokokken mittels der Agglutination. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. 44, p. 369.

1902. OBERMAYER (Fr.) et PICK. (E.-P.) — Biolog-chemische Studie über das Eiklar. *Wien. Klin Rundschau*.
1904. GILBERT et CARNOT. — Action de NaCl sur le Pneumocoque et l'infection pneumococcique. *C. R. Soc. Biol.*, t. 56, p. 925.
1905. LAFFORGUE. — Action favorisante de NaCl en solution hypertonique sur le pouvoir pathogène des saprophytes. *C. R. Soc. Biol.*, t. 57, p. 968.
1906. OBERMAYER (Fr.) et PICK (E.-P.) — Ueber die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweiskörper. *Bildung von Immunpräzipitinen durch chemisch veränderte Eiweiskörper* *Wien. Klin. Wochenschr.*
1907. DUNGERN und COCA. — Spezifische Hämolyse der durch Osmium fixierten Blutkörperchen. *Berl. Klin. Wochenschr.*, t. 44, n° 46, p. 1471.
1907. MADSEN et NYMANN. — Contribution aux études théoriques sur la désinfection. *Acad. Royale des Sc. et Lett. de Danemark. Bull. Ann.* 1907, n° 3. (Extrait).
1908. NICOLLE (M.), POZERSKI et ABT (G.). — Une conception générale des anticorps et de leurs effets. *Ann. Inst. Past.*, t. 22, pp. 26, 53, 132-171, 237-243.
1908. PICK und YAMANOÛCHI. — Studien über Anaphylaxie. *Wien. Klin. Wochenschr.*, n° 44, p. 940.
1909. CALMETTE et MASSOL. — Sur les conditions d'obtention de la réaction de déviation de l'alexine (Bordet-Gengou), avec les antigènes et les anticorps tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 67, pp. 528-530.
1909. FREUND, HERMANN. — Das biologische Verhalten jedier Eiweiskörper. *Biochem. Zeitschr.*, t. 20, p. 503.
1909. PICK und YAMANOÛCHI. — Chemische und exper. Beiträge zum Studium der Anaphylaxie. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, t. 1, p. 676.

1910. MULLER. — Ueber die Behinderung der Fäulnis in Organen durch Kochsalz und die Einwirkung von Kochsalz auf die Vitalität pathogener Bakterien in tierischen Geweben. *Zeit. f. infekt. und Hyg. der Haustiere*, f. 1-2, p. 30-53.
1910. WEIL(E). — Ueber die Bedeutung der Antigen Antikörperverankerung für die spezifische Komplementbindung. *Biochem. Zeitschr.*, t. 24, p. 219.
1911. ARMAND DELILLE. — Technique du diagnostic par la méthode de déviation du complément. *Masson*, Paris, p. 116.
1911. WEIL (E.) und SPÄT (W.). — Ueber den Mechanismus der Komplementbindung bei Antieiwisseris. *Ebenda*, t. 33, p. 63.
1912. CALMETTE (A.) et MASSOL (L.). — Détermination du pouvoir antigène des diverses tuberculines et titrages des sensibilisatrices ou anticorps des sérums de tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 72, p. 15.
1912. CALMETTE (A.) et MASSOL (L.). — Antigènes et anticorps tuberculeux. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 73, p. 120.
1912. CALMETTE (A.) MASSOL (L.) et MEZIE (A.). — Recherche et dosage des sensibilisatrices tuberculeuses ou anticorps au cours de la tuberculinothérapie par diverses tuberculines. *C. R. Soc. Biol.*, t. 73, p. 122.
1912. ERNST, P. PICK. — Biochemie der Antigene, mit bes. Berücksichtigung d. Antigenspezifität. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen Kolle und Wassermann*, Iena, t. 1, p. 684.
1912. KARAFFA-KORBUTT. — Zur Frage des Einflusses des Kochsalzes auf die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen. *Zeit. f. Hyg.*, t. 71, f. 1, p. 161.
1912. PICK (P.). — Biochemie d. Antigene, mit bes. Berücksichtigung d. Antigenspezifität. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen Kolle und Wassermann*. Iena, t. 1, p. 672.

1913. LASSEUR. — Observation sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries. *Recueil publié à l'occasion du jubilé scientifique du Prof. G. Le Monnier*, Berger-Levrault, Nancy, p. 106.
1913. NOIRÉ et P. Emile WEIL. — Note sur un milieu de culture pour le gonocoque. *C. R. Soc. Biol.*, t. 64, p. 1322.
1913. RANQUE et SÉNEZ. — Action de l'iode sur le B. d'Eberth. *C. R. soc. Biol.*, t. 1, p. 57.
1914. DUMAS (I.). — Études sur les Staphylocoques dorés. *Ann. Inst. Past.*, t. 28, p. 213.
1915. COUPIN. — Résistance à la salure des Bactéries marines. *C. R. Ac. des Sc.*, t. 160, p. 443.
1917. MADSEN et WALBUM. — Differianti toxinets svaekkelse. *Saert. af seuminstitutets, Festbind*, t. 9, p. 3.
1918. L. BAZY et CUVILLIER. — L'obtention d'auto-vaccins sensibilisés mono ou polyvalents au moyen du sérum de Leclainche et Vallée. *Presse Médicale*, 25 avril, p. 219.
1918. BLAIZOT. — Les effets de quelques réactifs chimiques sur l'endotoxine et le pouvoir antigène du Bacille d'Eberth. *C. R. Soc. Biol.*, t. 85, p. 356.
1918. FIESSINGER, RANQUE et SÉNEZ. — Les qualités antigéniques des microbes et les facteurs qui les influencent dans les cultures ascitées. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 81, p. 709.
1918. LE MOIGNIC et SÉZARY. — Nouvelle méthode de vaccination antityphoïdique. *Les actualités médicales*, Baillières, Paris, p. 49.
1918. RANQUE, SÉNEZ et FIESSINGER. — Des qualités antigéniques des microbes développés sur milieu ascite. *C. R. Soc. Biol.*, t. 81, p. 531.

1918. RANQUE, SÉNEZ et FIESSINGER. — Des qualités antigéniques du Streptocoque développé sur milieu ascite. *C. R. Soc. de Biol.*, t. 81, p. 392.
1919. LE DANTEC. — La mécanique de la vie. *Flammarion*, Paris, p. 163.
1919. MAGROU. — Les formes actinomycotiques du Staphylocoque. *Ann. Inst. Past.*, t. 33, p. 344.
1919. MAMELLE. — Contribution à l'étude du *Bacillus pyocyaneus* erythrogenes. *Th. Pharmacie Nanc.*, p. 82.
1919. MAUTÉ (A.). — Quelques remarques sur le traitement de la furonculose. *Presse médicale*, n° 73, 6 septembre, p. 729.
1919. NICOLLE, CESARI et JOUAN. — Toxines et antitoxines. *Masson*, Paris, pp. 3, 39, 44, 116.
1920. CALMETTE. — L'infection bacillaire et la tuberculose. *Masson*, Paris, p. 365.
1920. MAUTÉ (A.). — La vaccination antifuronculose. Stock-vaccins ou auto-vaccins ? *Presse Médicale*, n° 7, 24 janvier, p. 64.
1920. NICOLLE (M.). — Les antigènes et les anticorps. *Masson*, Paris, p. 76, 78.
1920. RANQUE et SÉNEZ. — Vaccination et Vaccinothérapie anti-pneumo streptococcique. *Marseille-Médical*, 1^{er} janvier, p. 23-30.
1921. DEMONCHY. — Vaccinothérapie dans les urétrites gonococciques aiguës. *Presse médicale*, n° 76, 21 septembre, p. 756.
1921. LASSEUR et SPILLMANN. — Réactions anticorps. Fasc. 1. *Berger-Levrault*, Nancy, p. 83.
1922. COSTA (S.). — Les vaccins bactériens formolés. *Presse médicale*, n° 91, 15 novembre, p. 985.

1922. MAUTÉ. — Traitement des infections colibacillaires des voies urinaires par le vaccin coli soude. *Journ. Méd. français*, t. 11, p. 225.
1922. SIERAKOWSKI. — Recherches sur les milieux. I. Rapport. Influence des différents agents sur la croissance des bactéries pathogènes dans les milieux gélosés. *Przegląd epidemiologiczny*, t. 2, Zeszyt 1 str., 20, Varsovie.
1922. SPEHL. — De l'influence du nombre de Bacilles de Koch sur le résultat des épreuves d'agglutination. *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 987.
1923. ARLAING et LANGERON. — Influence sur l'activité d'un vaccin antistaphylococcique de l'âge de la culture employée pour sa préparation. *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 220.
23. BESREDKA. — Etudes sur l'immunité locale. Staphylocoque : cuti-vaccination et cuti-immunité. *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 1273.
1923. HENRIQUES. — Technique de la numération des Bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, t. 88, p. 819.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	3
PREMIERE PARTIE :	
<i>Technique</i>	9
Milieux nutritifs	9
Préparation des émulsions	12
Méthode d'évaluation de la teneur du vaccin en corps microbiens	15
DEUXIEME PARTIE :	
I. — <i>Etude morphologique du Staphylocoque avant et après l'action des agents d'atténuation</i>	24
A) Examen microscopique avant l'atténuation..	24
B) Examen microscopique après l'atténuation..	27
II. — <i>Etude des variations physiologiques sous l'ac- tion des agents physico-chimiques</i>	32
A) Action de la température	33
B) Action de l'iode	37
C) Action du formol	42
D) Action de l'éther	46
TROISIEME PARTIE :	
<i>Etude des pouvoirs agglutinogènes et sensibilisogènes</i> ..	49
Agglutination	53
Recherche des sensibilisatrices	60
ANNEXE :	
Action du temps sur les vaccins	71
Préparation des vaccins	72
CONCLUSIONS GENERALES	76
LISTE DES AUTEURS CITES	79

Vu et bon à imprimer :

Nancy, le 13 octobre 1293

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

L. BRUNTZ.

Vu et permis d'imprimer :

Nancy, le 15 octobre 1923.

Le Recteur de l'Académie,

CH. ADAM,

Membre de l'Institut.

